Leuchtbakterien, Photobacterium phosphoreum und Achromobacter Fischeri, und ihre Beziehungen zu verschiedenen Pilzen

von

ELFRIEDE ELISABETH HESSE

Leuchtbakterien, Photobacterium phosphoreum und Achromobacter Fischeri, und ihre Beziehungen zu verschiedenen Pilzen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

vorgelegt

von

Elfriede Elisabeth HESSE

aus

Darmstadt

Oktober 1958

Berichterstatter: 1. Prof.Dr.F.BUKATSCH
2. Prof.Dr.L.BRAUNER

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1958

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Material und Methodik 3

A. Material 3

B. Methodik 3

1. Kultur der Organismen 4
2. pH-Messung 6
3. Lichtmessung 6

III. Versuche und ihre Ergebnisse 7

A. Suche nach geeigneten Nährböden 7

B. Prüfung der Pilzstämme auf Förderung des Leuchtens 12

a) Mit Photobacterium phosphoreum 12
b) Mit Achromobacter Fischeri 15

C. Das Leuchten auf Pilznährfiltrat und Mycel getrennt 15

D. Die pH-Bedingtheit des Leuchtens 18

a) Methode zur sterilen Entnahme 18
b) pH-Verhältnisse bei Gemeinschaft von Bakterien und Pilz 20
c) pH-Verhältnisse bei Pilzstämmen allein 22
d) pH-Verhältnisse bei Bakterienkulturen mit und ohne Chemikalienzusatz 22

E. Die Untersuchung der Fusarienkulturen und ihrer Nährfiltrate 24

1. Die Aminosäuren von Fusarium semitectum und Fusarium oxysporum 7 24
2. Das Fluoreszenzvermögen 25
3. Ein riboflavinähnlicher Farbstoff 26
4. Nachweis von Thiamin 26

Seite

F. Beeinflussung des Leuchtens durch Zusatz verschiedener Substanzen unter Beachtung des pH-Wertes . . 29

1. Vergleichende Tabelle der zum Leuchtprozeß in Beziehung stehenden Polypeptide mit den gefundenen Aminosäuren der Fusarien 29

2. Der Einfluß von Eiweißstoffen, bzw. Bausteinen 32

a) WITTE-Pepton 32
b) Casein-Pepton MERCK 32
c) Fleisch-Pepton MERCK 32
d) Hühnerei 32
e) Protaminsulfat 35

3. Der Einfluß von bestimmten Aminosäuren 35

a) Valin 36
b) Arginin 36
c) Lysin 36
d) Prolin 39
e) Glycin 39
f) Threonin und Methionin 39
g) Phenylalanin, Tyrosin sowie Serin 43
h) Weitere Aminosäuren, deren Wirkungen früher schon näher untersucht wurden . . . 43

4. Der Einfluß von Vitaminen der B-Gruppe 50

5. Der Einfluß von Thiaminaseaktivatoren 53

a) Pyridin 53
b) Chinolin 55
c) Anilin 55

6. Der Einfluß der Chinasäure 55

V. Diskussion der Ergebnisse 60

V. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse 64

I. Literaturverzeichnis 66

I. Einleitung.

Das Leuchten in der lebenden Natur ist ein Phänomen, welches uns immer wieder fesselt. Ein wunderbares Bild bieten leuchtende Meere. Dieses Leuchten wird meistens durch Geißelträger, Noctiluca miliaris, hervorgerufen. An lebenden und auch an toten Meerestieren finden sich Leuchtbakterien, entweder symbiontisch (Leuchtorgan der Tiefseeorganismen) oder epiphytisch. Zur letzten Gruppe zählen unter anderen Photobacterium phosphoreum und Achromobacter Fischeri.

MOLISCH, der erstmals die Beobachtung machte, die meinen Untersuchungen zu Grunde liegt, will ich mit seinen eigenen Worten zitieren:

"Eine Bacterium phosphoreum Kultur leuchtet in den ersten Tagen sehr stark, dann beginnt die Kultur wegen Mangel an Leuchtnahrung zu erlöschen. Öffnet man jetzt die Schale auf einige Minuten, so daß Luftkeime hineinfallen, so entwickeln sich gewöhnlich in den folgenden Tagen isolierte Rasen von Penicillium, Aspergillus und Kolonien verschiedener Bakterien. Im Finstern betrachtet, erscheint jeder Rasen und fast jede Kolonie samt ihrer nächsten Umgebung als ein intensives Lichtfeld auf dunklem Grunde."

Diese Angaben wurden später von FRIEDBERGER und DOEPNER (1907) bestätigt. Sie stellten diesen Einfluß, nämlich das längeranhaltende Leuchten der Bakterien, in Gegenwart eines Pilzes mit Mucor stolonifer, Penicillium glaucum, zwei Aspergillus niger- und zwei Aspergillus fumigatus- Stämmen fest. Allen genannten Kulturen kam außerdem die Fähigkeit zu, die Intensität des Lichtes der Leuchtbakterienkulturen zu steigern.

Als einzigen Unterschied gegenüber Bakterien-Reinkulturen erkannten sie mittels Titration eine pH-Verschiebung der Filtrate der Pilzbouillonkulturen nach dem Alkalischen, die sonst nicht festzustellen war. In verschiedenen Versuchsreihen wurden die

Kontrollbouillonkulturen auf denselben pH-Wert gebracht. Jedoch die mit filtrierter Pilzbouillon versetzten Bakterienkulturen zeigten das intensivste Leuchtvermögen. Das Leuchten der Bouillonkontrollkultur gleichen pH-Wertes wies ein geringeres, aber immerhin durchweg stärkeres Leuchten als die Bouillonreihe ohne vorherige Korrektur des pH-Wertes auf. Versuche mit abgetöteten Pilzrasen ergaben eine deutliche Herabsetzung des Leuchtvermögens. Die Autoren stellten die Leuchtstärke auf photometrischem Wege durch Schwärzung einer Bromsilberplatte vergleichend fest. Weitere Versuche wurden von FRIEDBERGER und DOEPNER nicht durchgeführt. Sie ließen die Annahme offen, daß vitale Leistungen der Pilze eine Förderung des Leuchtvermögens des Bacterium phosphoreum bewirken. Außerdem sind keine Untersuchungen darüber beschrieben, wie lange die Gegenwart von Pilzmycelien das Leuchten zu unterhalten vermag.

Da weder bekannt ist, welche Pilze, außer den obengenannten, das Leuchten fördern, noch wie lange sie dieses vermögen, erschien es interessant, bei einer Weiterverfolgung dieses Phänomens festzustellen:

a) welche Pilze hauptsächlich für eine Begünstigung des Leuchtprozesses des Photobacterium phosphoreum in Frage kommen,

b) wie lange eine gemeinschaftliche Pilz-Bakterienkultur leuchten kann und

c) welches die Stoffe und Vorgänge sind, die das Leuchten über lange Zeit ermöglichen.

Gegenstand vorliegender Arbeit ist es, auf diesen Gebieten Aufschlüsse zu geben. Außerdem werden einige das Leuchten betreffende Vergleichsversuche mit Achromobacter Fischeri durchgeführt. Versuche mit Peptonen, Aminosäuren, Vitaminen der B-Gruppe, Thiaminaseaktivatoren, Antibioticis sowie Chinasäure, die auf Grund von Versuchs- und Analysenergebnissen durchgeführt wurden, sollten der weiteren Aufklärung der den Leuchtprozeß fördernden Stoffe dienen.

II. Material und Methodik.

A. Material.

Für die Durchführung der Versuche standen

ein Stamm Photobacterium phosphoreum,
ein Stamm Achromobacter Fischeri

und folgende Pilzstämme zur Verfügung:
(Die Pilzstämme wurden numeriert und erscheinen in den einzelnen Versuchen der Übersichtlichkeit wegen unter Angabe der hier erteilten Nummer.)

1 = Aspergillus sp.
2 = Penicillium sp.
3 = Penicillium chrysogenum
4 = Aspergillus sp. gelb
5 = Penicillium notatum
6 = Penicillium citricum
7 = Rhizopus nigricans
8 = Botrytis cinerea
9 = Aspergillus ochraceus
10 = Penicillium luteum
11 = Mucor racemosus
12 = Absidia spinosa
13 = Isaria densa
14 = Aspergillus niger
15 = Marasmus candidus
16 = Torulopsis luteola
17 = Saccharomyces pastorianus
18 = Aspergillus fumigatus
19 = Coprinus picaceus
20 = Saccharomyces ellipsoideus
21 = Neurospora tetrasperma Sheat Dodge
22 = Cephalotecium roseum

23 = Absidia cylindrospora (+ Stamm)
24 = Penicillium roquefortii
25 = Fusarium culmorum
26 = Rhizopus oryzae
27 = Penicillium camenbertii
28 = Mucor hiemalis (- Stamm)
29 = Fusarium nivale
30 = Fusarium sp. (Erdabimpfung) = "Erde"
31 = Fusarium graminearum
32 = Fusarium lycopersicum
33 = Fusarium semitectum
34 = Saccharomyces cerevisiae
35 = Fusarium sp. (Orchisabimpfung) = "orchis"
36 = Fusarium oxysporum 14
37 = Fusarium oxysporum 7
38 = Rhizoctonia solani
39 = Pythium de Baryanum
40 = Verticillium sp.
41 = Fusarium sp.
42 = Phycomyces blakesleeanus
43 = Fusarium sp. (Stamm x) = "x"

Für Überlassung von Pilzstämmen danke ich Frau Prof. Dr. NIETHAMMER, Herrn Prof. Dr. BUKATSCH, Herrn Dr. POSCHENRIEDER, Herrn Dr. NEUMANN, Herrn Dr. MÜLLER. Weitere Pilzstämme wurden aus der Sammlung des Botanischen Universitätsinstituts München entnommen.

B. Methodik.

1. Kultur der Organismen.

Die Reinkultur des Photobacterium phosphoreum habe ich von Herrn Dr. SIX übernommen.

Die Kultur wird in Schrägagarröhrchen gehalten und immer wieder überimpft sowie mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft. Photobacterium phophoreum ist kokkenförmig, nicht beweglich, nicht gelatineverflüssigend. Sein Temperaturoptimum liegt bei 15° bis 18° C. Für die Weiterkultur ist folgender Nährboden am günstigsten geeignet:

250 Gramm grüne Heringe werden mit
1 Liter destilliertem Wasser und
30 Gramm Natriumchlorid gekocht,

filtriert und auf 1Liter ergänzt. Hinzugefügt werden

WITTE- Pepton	10 Gramm
Glyzerin	5 Gramm
Agar	30 Gramm.

pH 7 ist günstig.

Für genau definierte Flüssigkeitskulturen ist folgende Zusammensetzung zweckmäßig:

In 100 Gramm destilliertem Wasser werden gelöst:

$Ca(NO_3)_2$	0,02 Gramm
$MgSO_4$	0,02 Gramm
K_2HPO_4	0,02 Gramm
$FeSO_4$	eine Spur
NaCl	3,0 Gramm
Glyzerin	0,5 Gramm
Glutaminsäure	0,05 Gramm

Die Lösung wird vor dem Sterilisieren auf pH 7,5 eingestellt. Für Achromobacter Fischeri (Kultur von Herrn Prof. HUG, Regensburg) gelten die gleichen Nährbodenzusammensetzungen.

Die Pilzstämme wurden auf Bierwürze-Schrägagarröhrchen, die Fusarien zeitweise auf gelben Rübenstücken gezüchtet. Da eine Beschreibung aller verwendeten Pilze diese Arbeit zu umfassend gestalten würde, will ich nur kurz auf die Fusarien eingehen.

Die Gattung Fusarium gehört zur Familie der Tuberculariaceae, die den Fungi imperfecti untergeordnet ist. Das typischste Kennzeichen der Fusarien sind ihre sichelförmigen Konidien. Farbstoffbildungen, die einen regen Stoffwechsel erkennen lassen, treten häufig auf. Fusarium semitectum bildet cremefarbene Kolonien, Fusarium culmorum ist rosa, Fusarium lycopersicum weist einen ähnlichen Farbton auf. Andere Fusarienstämme sind nicht so auffallend gefärbt. Diese Farbstoffbildungen wurden auf Bierwürze-Agar beobachtet. Die Farben der Mycelien und ihrer Nährlösungen können sich teilweise in Nährmedien anderer Zusammensetzung ändern oder nicht so intensiv sein.

Fusarien sind typische Bodenbewohner. Man findet sie aber auch vielfach auf Pflanzen, deren Leben sie dann meistens infolge Bildung von Welketoxinen schnell beenden. Hierdurch haben sie bedeutendes landwirtschaftliches Interesse. Außerdem bilden sie oft watteartige Überzüge, die Schaden in Molkereien, Wasserrohren und Drainagen verursachen. In Notzeiten kann ihr Fettbildungsvermögen Bedeutung finden, für welches ein Wachsen auf einer einprozentigen Saccharoselösung oder auf Ablaugen von Zellulosefabriken recht günstig ist. Sie besitzen eine Reihe von Fermenten und sind je nach Nährböden befähigt, Eiweiß, organische Säuren und Alkohol zu bilden.

2. pH- Messung.

Die pH- Messungen der Substrate wurden elektrometrisch mit einem geeichten Instrument der Firma PUSL, München, durchgeführt, wobei die Meßelektrode, eine Glaselektrode, direkt in die Kulturflüssigkeit eintauchte.

3. Lichtmessung.

Die Messung der Leuchtwerte erfolgte mit nachstehend beschriebenem Gerät. Meßversuche mit einer normalen Photozelle scheiterten leider an zu geringer Empfindlichkeit derselben. Es erwies

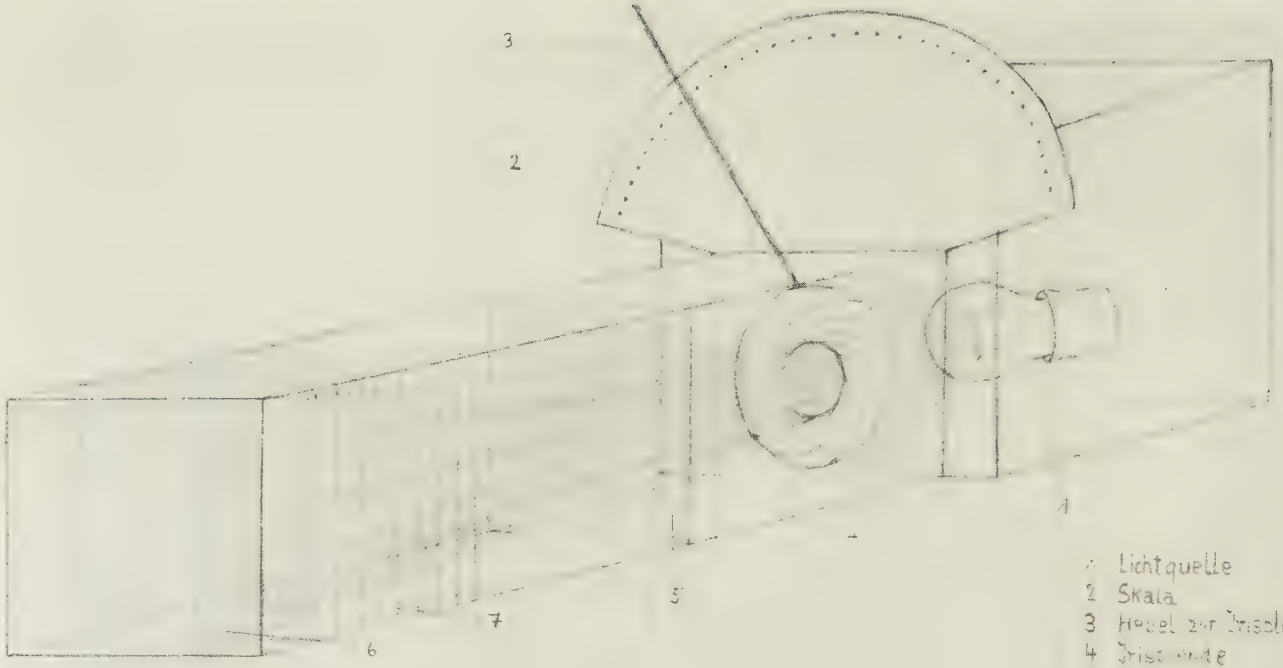

3
2
7
5
6
1
1 Lichtquelle
2 Skala
3 Hebel zur Irisblende
4 Iris-Blende
5 Milchglas
6 Milchglas
7 einige Filter zur Farbgebung

Abbildung 1

sich als unbedingt erforderlich, ein Gerät zu konstruieren, welches ermöglichte, ganz im Dunkeln zu arbeiten. Außerdem ist es für die Kulturen günstig, sie nicht ständig öffnen zu müssen.

Ich ließ eine Irisblende in einen Kasten einbauen. Als Lichtquelle diente eine Glühbirne, die wegen ihrer Wärmewirkung in einem größeren hinteren Raum angebracht wurde. Vor der Blende befinden sich zwischen zwei Milchglasscheiben verschieden gewählte Filter, die dem Farbton des Bakterienlichtes entsprechen. Das von der Apparatur kommende Licht gleicht in Helligkeit, Farbe und ausstrahlender Fläche genau dem der Erlenmeyerkolben, gefüllt mit Leuchtbakterien-Flüssigkeitskultur, die in einer bestimmten Schräglage zum Vergleich stets in gleicher Lage daneben gehalten wird. Die Irisblende ist mit einem zu bedienenden Hebel versehen, der über eine Skala läuft. Erhabene Graduierungen ermöglichen auch im Dunkeln ein genaues Ablesen der Werte. Nur in einigen Fällen außergewöhnlich hoher Meßwerte erwies sich die Apparatur als nicht vollkommen ausreichend. Die Helligkeitsabstimmung des Vergleichslichtes erfolgte nach 15 Minuten langer Dunkeladaption des Auges durch Betätigen der Irisblende. (Siehe Abbildung 1).

Die Versuche wurden in einem gänzlich dunklen Kellerraum bei konstanter Temperatur zwischen 16° C und 17° C durchgeführt.

III. Versuche und Ergebnisse.

A. Suche nach geeigneten Nährböden.

Es galt zuerst den geeigneten Nährboden zu finden, der sowohl für Photobacterium phosphoreum, als auch für die einzelnen Pilzstämme gutes Gedeihen gewährte. Nach sehr vielseitigen Vorversuchen

erwies sich der bereits erwähnte flüssige synthetische Nährboden (siehe Seite 5) als durchaus gut verwendbar.

Wie in späteren Versuchen noch ausführlicher behandelt wird, war ein zweiprozentiger Zusatz von C h i n a s ä u r e zu dieser vollsynthetischen Nährlösung äußerst günstig für Photobacterium phosphoreum und Fusarien.

Flüssige Nährböden für Photobacterium phosphoreum, die statt Glutaminsäure V a l i n, L y s i n, P y r i d i n, A n i l i n oder C h i n o l i n enthielten, zeigten gute Leuchtwerte. Günstige Leuchtwerte mit Asparaginsäure und Glykokoll wurden schon 1933 von MUDRAK erzielt. BUKATSCH hatte 1936 mit Glutaminsäure seine besten Ergebnisse. Mit Leucin, Serin und Alanin konnte er gutes aber nicht so starkes Leuchten feststellen.

Um Zellulose auf ihre Eignung als Zusatz zum gemeinschaftlichen Nährmedium zu überprüfen, wurden Versuche mit acht verschiedenen Fusarienstämmen durchgeführt. In jeden Kolben wurde zusätzlich ein Stück Filtrierpapier gegeben. Nach anfänglich üblichem Leuchtverlauf war das Leuchten bei allen Kulturen nach einhundertfünfzig Tagen bereits beendet.
Zellulose ist an sich ein gutes Nährsubstrat für Fusarien. Es ist möglich, daß bei Zellulosezusatz Stoffe anderweitig genutzt werden, die für den Leuchtprozeß wesentlich sind und so ein frühzeitiges Ende des Leuchtens bedingen, es könnten auch Stoffwechselprodukte entstehen, die leuchthemmend wirken.

Das Leuchten der Bakterien-Pilzkulturen war auf zweiprozentigem synthetischen Agarboden viel begrenzter als auf dem gleichen flüssigen (gemäß Zusammensetzung Seite 5). Es ist dabei zu berücksichtigen, daß die Gegebenheiten im flüssigen Medium für Photobacterium phosphoreum günstiger sind, da ja die von den Pilzen in die Lösung abgegebenen Wirkstoffe den Bakterien gleichmäßig zur Verfügung stehen. Dies wird durch Schütteln noch

wesentlich gefördert. Beim festen Nährboden können die Wirkstoffe nur ihre unmittelbare Umgebung versorgen und so nicht voll ausgenutzt werden. Photobacterium phosphoreum ist bezüglich Wasser und Nährstoffe bedeutend anspruchsvoller als die mit ihm in den Versuchsreihen in Gemeinschaft lebenden Pilze. Der, wenn auch nur langsam austrocknende Nährboden bietet ständig ungünstiger werdende Verhältnisse für die Aufnahme der Nährsalze, insbesondere des in rel. großen Mengen benötigten Natriumchlorids. Reine Photobacterium phosphoreum Kulturen zeigten üppiges Wachstum auf wasserreichen Agarnährböden, während auf wasserarmen Böden die Kolonien kaum zu erkennen waren.

Die Versuche zeigten, daß die Pilze auf dem festen Boden das Photobacterium phosphoreum weitgehend verdrängen und teilweise überwuchern.
Der feste Boden wurde nicht in Petrischalen sondern in Erlenmeyerkolben schräg ausgegossen, die mit Wattestopfen versehen wurden. Es war so eine größere Sterilität gewährleistet als auf Petrischalen. Denn bei allen Versuchen mußte unbedingt von Anfang an eine Infektion durch andere Pilze verhindert werden, um ein falsches Ergebnis auszuschließen. Tabelle 1 auf Seite 10 gibt eine Übersicht über das Verhalten einiger Pilzstämme auf festem und auf flüssigem Nährmedium sowie einen Vergleich mit reinen Photobacterium Kulturen.
Bei den reinen Photobacterium Kulturen in flüssigem synthetischem Nährmedium war nach längstens sieben Tagen die Lösung so a n g e s ä u e r t, daß das Leuchten schon allein dadurch ein Ende fand. Photobacterium phosphoreum ist selbst nicht in der Lage, die Nährlösung auf einen für den Leuchtprozeß günstigen pH-Wert zu erhalten.
Auffallend ist die Hemmung des Leuchtprozesses durch Penicillien. Penicillium sp.(= Stamm 2) und Penicillium chrysogenum (= Stamm 3), in Tabelle 1 nicht aufgeführt, verhielten sich genau so wie Penicillium notatum (= Stamm 5). Das Aufhören

Tabelle 1

Vergleiche der Leuchtdauer des Photobacterium phosphoreum allein und mit einigen Pilzstämmen, mit Ziffern angeführt, auf festem und auf flüssigem Nährmedium.

	Photobacterium allein		5		7		8		11		25	
	fest	flüssig	fest	flüssig	fest	flüssig	fest	flüssig	fest	flüssig	fest	flüssi
1. Tag	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. "	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-
3. "	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-
4. "	+	+			+	+	+	+	+	+	+	-
5. "	+	+			+	+	+	+	+	+		-
6. "	+	+			+	+	+	+	+	+		-
7. "	+	+			+	+	+	+	+	+		-
8. "					+	+	+	+	+	+		+
9. "					+	+	+	+	+	+		+
10. "					+	+	+	+	+	+		+
11. "					+	+	+	+	+	+		+
12. "					+	+		+	+	+		-
13. "					+	+		+	+	+		-
14. "						+		+		+		-
15. "						+		+		+		-
16. "						+		+		+		-
17. "						+		+		+		-
18. "						+		+		+		-
19. "						+		+		+		-
20. "						+		+		+		+
21. "								+		+		+
22. "								+		+		+
23. "								+		+		+
24. "								+		+		+
25. "								+		+		+
26. "								+		+		+
27. "								+		+		+
28. "								+		+		+
29. "								+		+		+
30. "								+		+		+
31. "								+		+		+
32. "								+				+
33. "								+				+
34. "								+				+
35. "												+
36. "												+
37. "												+
38. "												+
39. "												+
40. "												+

usw

-	40		41	
	fest	flüs-sig	fest	flüs-sig
	+	+	+	+
	+	+	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+	-
	-	-		-
	+	-		-
	+	-		-
		-		-
		-		-
		-		-
		-		-
		-		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		+		+
		usw.		usw.

Stamm 40 leuchtete noch bis zum 47. Tag. Die Stämme 25 und 41 wurden bis zum 90. Tag beobachtet. Der Leuchtprozeß war am 90. Tag noch nicht beendet. Stämme 2 und 3 (in der Tabelle nicht aufgeführt) leuchteten genau so lange wie Stamm 5.

des Leuchtens dieser Versuchsreihe in Gegenwart von Penicillien nach zwei Tagen ist wohl auf Ektotoxinbildung von Penicillinsäure, die den Leuchtprozeß hemmt (KAVANAGH,1947), zurückzuführen. Eine ähnliche Wirkung dürfte auch der Aspergillinsäure der meisten Aspergillusstämme zukommen sowie dem Gliotoxin (RAKE, McKEE, JONES, 1942), das von verschiedenen Pilzen gebildet wird.
Meine Versuche mit Penicillin im Lochtest zeigten eine Verminderung der Leuchtkraft. Streptomycin ließ keinen Unterschied zu den Vergleichsplatten erkennen.
Das Leuchten in Gegenwart von Fusarium culmorum (= Stamm 25) und Fusarium sp. (= Stamm 41) war nach neunzig Tagen noch nicht beendet.
Weitere Versuche mit Rhizoctonia solani und Phythium de Baryanum (in Tabelle 1 nicht aufgeführt) ergaben folgendes:
Mit Rhizoctonia solani hielt das Leuchten fünfundsiebzig Tage im flüssigen Nährmedium an. Es traten Pausen im Leuchtprozeß vom fünften bis elften Tag, vom zwanzigsten bis zum siebenunddreißigsten, vom dreiundsechzigsten bis zum siebzigsten Tag auf.
Gemeinschaftliche Pythium de Baryanum-Kulturen leuchteten auf festem Nährboden fünfundvierzig Tage.

Das Leuchten einer reinen Photobacterium phosphoreum Kultur auf festem Boden mit Pepton und Fischbrühe war am dritten Tage meistens schon sehr minimal. Beimpfte man ein Schrägagarröhrchen nur bis zur Hälfte, so konnte man bis zu etwa zwölf Tagen einen langsam weiterwachsenden Streifen von zwei Millimeter Tiefe und Reagenzglasbreite beobachten. Man hat großes Glück, wenn man von einer vierzehn Tage alten Kultur noch Photobacterium phosphoreum weiterziehen kann. Das Sicherste zur Erhaltung der Kulturen ist ein Überimpfen mindestens jeden dritten Tag.
Bei festem ein Jahr gelagertem Fischbrühnährboden konnte man feststellen, daß an Stellen, wo sich Pepton vermehrt fand, ein besseres Leuchten war.

Ein sehr müheloses Erhalten der Photobacterium Kultur sowie der Fusarien Kulturen bietet das Abimpfen aus gemeinschaftlichen Flüssigkeitskulturen auf die jeweiligen Selektivnährböden. Von flüssigen Photobacterium Kulturmedien, die in Gegenwart von Pilzen über sechshundert Tage lang geleuchtet hatten, konnten nach bereits vier Wochen andauerndem Nichtleuchten, auf einen frischen Spezialnährboden gebracht, Pilzkulturen und leuchtende Photobacterium phosphoreum Kulturen isoliert werden.

B. Prüfung der Pilzstämme auf Förderung des Leuchtens.

a) Mit Photobacterium phosphoreum.

Die bereits erwähnten Pilzstämme wurden zwei Jahre auf ihre das Leuchten des Photobacterium phosphoreum fördernde Wirkung beobachtet. Die mit 125 Gramm Nährlösung beschickten 1/2 l- Erlenmeyerenghalskolben wurden sterilisiert und mit Pilstämmen beimpft. Sobald diese sich gut sichtbar entwickelt hatten, erfolgte die Photobakterienimpfung. In einem vollkommen verdunkelten Raum verglich ich nach einer Adaptionszeit von mindestens fünfzehn Minuten die Leuchtstärke und fand so die das Leuchten fördernden Pilzstämme. Einige Fusarien stämme und Saccharomyces cerevisiae bewirkten ein außergewöhnlich langes und gutes Leuchten.

Es wurden als besonders fördernd festgestellt:

Fusarium oxysporum 14	658 Tage
Fusarium oxysporum 7	643 Tage
Fusarium semitectum	675 Tage
Fusarium "orchis"	640 Tage
Saccharomyces cerevisiae	566 Tage

Der Verlauf des Leuchtprozesses von siebenunddreißig verschiedenen Pilzstämmen ist in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgeführt. Die Ergebnisse der Versuche mit Fusarien sind als besonders gesichert anzusehen, da diese Versuche mindestens dreimal wiederholt wurden. Es wurden bei den Fusarien zwei Versuchsreihen aufgeführt. Jede Versuchsreihe ist mit der Nummer des Pilzes bezeichnet mit dem der Versuch durchgeführt wurde. Die angegebene zweite Versuchsreihe ist zusätzlich mit dem Buchstaben a gekennzeichnet. Wenn die Dauer des Leuchtens sehr unterschiedlich war, wurden die beiden extremsten Ergebnisse angeführt.

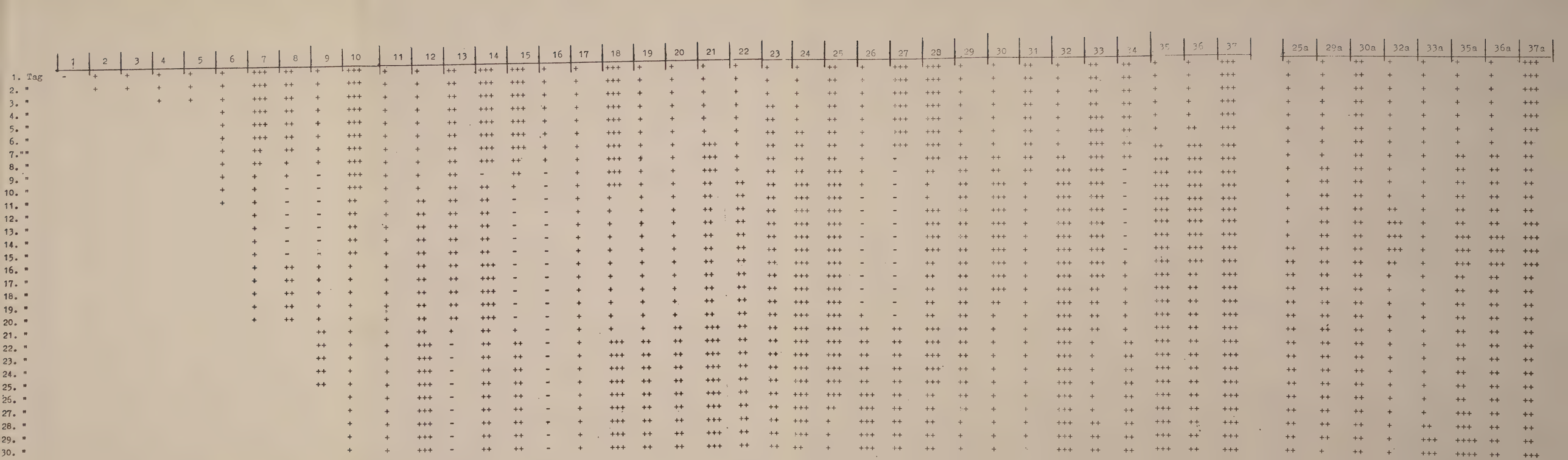
Da außer Saccharomyces cerevisiae einige Fusarienstämme die zeitlich besten Leuchtwerte zeigten, wurden alle w e i t e r e n V e r s u c h e n u r m i t F u s a r i e n durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die Leuchtwerte durch die Zeichen + und - angegeben. Es bedeuten:

- = kein Leuchten
+ = mäßiges Leuchten
++ = gutes Leuchten
+++ = sehr gutes Leuchten
++++ = besonders gutes Leuchten

Tabelle 2

Vergleichende Tabelle des Leuchtverlaufs des Photobacterium phosphoreum in Gegenwart verschiedener Pilze (in flüssigem Nährmedium).


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 25a 29a 30a 32a 33a 35a 36a 37a
1. Tag
2. "
3. "
4. "
5. "
6. "
7. ""
8. "
9. "
10. "
11. "
12. "
13. "
14. "
15. "
16. "
17. "
18. "
19. "
20. "
21. "
22. "
23. "
24. "
25. "
26. "
27. "
28. "
29. "
30. "

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	25a	29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
31. Tag	++	++	-	++	+++	-	-	++	+++	++	+++	++	++	++	+	+++	++	++	-	+	+	+++	++	++	+++	++	+++	++	+	+++	++	+++	++++	++	+++
32. "	++	++	-	++	+++	+	-	++	+++	++	+++	++	++	++	+	++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+++	++	++	+	-	++++	++	+++	++++	+++	++++
33. "	++	++	-	++	+++	++	-	++	+++	++	+++	++	++	++	+	++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	++	++	+	-	-	+++	++	+++	++++	++++	++++
34. "	++	++	-	++	+++	++	-	++	+++	++	+++	++	++	++	+	++	++	+++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	++++	+++	+++
35. "	++	++	-	++	+++	++	++	++	++	+++	++	+++	++	+	+	++	++	+++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	++++	+++	+++
36. "		+	++	++	+++	++	++	++	-	+++	++	+++	++	+	+	++	++	+++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	++++	+++	+++
37. "		+	++	++	+++	++	++	++	-	+++	++	+++	++	+	+	+++	++	+++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	++++	+++	++
38. "		+	++	++	+++	++	++	++	-	+++	++	+++	+++	+	+	+++	++	+++	-	+	+	+++	+++	+++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	++++	+++	++
39. "		+	++	++	+++	++	++	++	-	+++	++	+++	+++	+	+	+++	++	+++	-	+	+	+++	+++	+++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	++++	++	++
40. "		+	++	++	+++	++	++	++	-	+++	++	+++	+++	+	+	+++	++	+++	-	+	+	+++	+++	+++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	+++	++	++
41. "			+	++	++	++	-	+++	-	-	+	+++	+++	++	+	+++	++	+++	-	+	+	+++	+++	+++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	+++	++	++
42. "				++	-	++	-	+++	-	-	+	+++	+++	++	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	++	+++	++	++	++
43. "				++	-	++	-	+++	-	-	+	+++	+++	++	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	+++	+++	++	++	+
44. "				++	-	++	-	+++	-	-	+	+++	+++	++	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	+++	+++	++	++	+
45. "				++	-	++	-	+++	-	-	+	+++	+++	++	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	+++	+++	++	++	+
46. "				++	-	++	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	+++	+++	++	++	+
47. "				++	++	++	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	+++	+++	++	++	+
48. "				++	+++	++	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+++	+++	+++	++	++	+
49. "				++	+++	++	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	++	+++	++	++	++	+
50. "				++	+++	++	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	++	+++	++	++	++	+
51. "				++	+++	+	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	++	+++	++	++	++	+
52. "				++	++	+	-	++	++	+++	++	++	+++	+	+	+++	++	+	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	++	+++	++	++	++	+
53. "				++	++	+	-	++	++	+++	++	++	++	+	+	+++	++	+	-	+	+	+++	+++	++	+	++	+	-	-	+	+++	+++	++	++	+
54. "				++	++	+	-	++	++	+++	++	++	++	+	+	+++	++	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	-	-	-	+++	+++	++	++	+
55. "				++	++	+	-	++	++	+++	++	++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	-	-	+++	+++	++	++	+
56. "				++	++	+	-	++	++	++	++	++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	-	-	+++	+++	++	++	+
57. "				++	++	+	-	++	++	++	++	++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	-	-	++	+++	++	++	+
58. "				++	++	+	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	-	-	++	+++	++	++	+
59. "				++	++	+	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	-	-	++	+++	++	++	+
60. "				++	++	+	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	+

	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	25a	29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
61. Tag	++	+++	+++	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	+
62. "	++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	+
63. "	++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	+++	+++	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	+
64. "	++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	+	+	-	+	+	+++	++	+++	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	+
65. "	++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	++	+	-	+	+	+++	++	+++	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	+
66. "	++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	++	+	-	+	++	+++	++	+++	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	+
67. "		+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	++	+	-	+	++	+++	++	+++	+	++	+	+	+	+	++	+++	++	++	+
68. "		+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	++	+	-	+	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	++	++	+++	++	++	+
69. "		+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	++	+	-	+	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	++	++	+++	++	++	+
70. "		+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	++	++	+	+	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	++	++	+++	++	++	+
71. "		+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	-	+++	++	++	+	+	++	+++	-	+++	+	++	+	+	+	++	++	+++	++	+++	+
72. "		++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	-	+++	++	++	+	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+	+	++	++	+++	++	+++	+
73. "		++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	-	+++	++	++	+	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+	+	++	++	+++	++	+++	++
74. "		++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++
75. "		++	+++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	++	+++	++	+++	+++	++	++
76. "			+++	-	-	+	++	++	++	+	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	++	+++	++	++	+++	++	++
77. "			+++	-	-	-	++	++	++	+	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	++	+++	++	++	+++	++	++
78. "			+++	-	-	-	++	++	++	+	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++		++	++	+++	++	++	+++	++	++
79. "			+++	-	-	-	++	++	++	+	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	++	+++	++	++	+++	++	++
80. "			+++	-	-	-	++	++	++	+	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	-	++	++	+++	++	++	+++	++	++
81. "			+++	-	-	-	++	++	++	+	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	-	+++	++	+++	++	++	++	++	+++
82.."			+++	-	-	-	++	++	++	+	+	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+++	++	+++	++	++	++	++	+++
83. "			+++	-	+	-	++	+	++	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	-	+++	++	+++	++	++	++	++	+++
84. "			+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+++	++	+++	++	++	++	++	+++
85. "			+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+++
86. "			+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+++	++	++	+++	++	++	++	+++
87. "			+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+++	++	++	+++	++	++	++	+++
88. "			+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	++	+	+++	++	+	+++	+++
89. "			+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	++	+	+++	++	+	+++	+++
90. "			+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+	++	+	+++	++	+	+++	+++

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
91. Tag	+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	++	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	+	+++	++	+	++	+++
92. "	+++	-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	-	+++	+	++	+	++	+	+++	++	+	++	+++
93. "		-	+	++	++	+	+	+	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	-	+++	+	++	+	+	+	+++	++	+	++	+++
94. "		-	+	+++	+	-	+	-	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	+++	++	+	++	+++
95. "		-	+	+++	+	-	+	-	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	++++	++	++	+	+++
96. "		-	+	+++	+	-	+	-	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	++++	++	++	+	+++
97. "		+	+	++	+	+	+	-	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	++++	++	++	+	+++
98. "		+	+	++	+	+	+	-	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	++	+++	++	++	+	+	+	++++	++	++	+	+++
99. "		+	+	++	+	+	+	-	-	-	+++	++	++	+	-	++	+++	++	+++	++	++	+	+	+	++++	++	++	+	+++
100. "		+	+	++	+	+	+	-	-	-	+++	++	++	+	-	++	++	++	+++	++	+++	+	+	+	++++	++	++	+	+++
101. "		+	+	++	+	+	+	-	-	+	+++	++	++	+	-	++	-	++	+++	++	+++	+	+	+	++++	++	++	+	+++
102. "		+	+	++	+	+	+	-	-	++	+++	++	++	++	+	++	-	++	+++	+++	+++	+	+	+	++++	++	++	-	+++
103. "		+	+	++	+	+	+	-	-	++	+++	+++	++	++	+	++	-	++	++	+++	+++	+++	+	+	++++	++	++	-	+++
104. "		+	+	++	+	+	+	-	-	++	+++	+++	++	++	+	++	-	++	++	+++	+++	+++	+	+	++++	++	++	-	+++
105. "		+	+	++	+	+	+	-	-	++	+++	+++	++	++	+	++	-	++	++	+++	+++	+++	+	+	++++	++	++	-	+++
106. "		+	+	++	+	+	+	-	-	++	+++	+++	++	++	+	++	-	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+++
107. "			+	++	+	+	++	-	-	++	+++	+++	++	++	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+++
108. "				+	+	+	++	+	-	++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+++
109. "				+	+	+	++	+	-	++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	++	-	+++
110					+	+	++	+	-	++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	++	-	+++
111. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	++	-	+++
112. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	++	-	+++
113. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	++	-	+++
114. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	++	-	+++
115. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	++	-	+++
116. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	+++	-	+++
117. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	+++	-	+++
118. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	+++	-	+++
119. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	+++	-	+++
120. "					+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	+++	++	+++	-	+++

	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
121. "	+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+	-	+++	++	+++	+	+++
122. "	+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	+	+++	+++	+	-	+++	++	+++	+	+++
123. "	+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	+	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
124. "	+	+	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
125. "	+	++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
126. "	+	++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
127. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
128. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
129. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
130. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
131. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	++	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
132. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	+	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
133. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	+	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
134. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	+	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	+++	++	+++
135. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	+	+	-	+	+	++	++	-	++	+++	+	-	+++	++	++	++	+++
136. "		++	++	++	-	+++	+++	+++	+	+	-	+	+	++	++	-	+	+++	+	-	+++	++	++	++	+++
137. "		+	++	++	-	+++	+++	++	+	+	-	+	+	++	+++	-	+	+++	+	-	+++	++	+	++	+++
138. "		++	++	++	-	+++	+++	++	+	+	-	+	+	++	+++	-	-	+++	+	-	+++	++	-	++	+++
139. "		++	++	++	-	+++	+++	++	+	+	-	+	+	++	+++	-	-	+++	+	-	+++	++	-	++	+++
140. "		++	++	++	-	+++	+++	++	+	+	-	+	+	++	+++	-	-	+++	+	-	+++	++	-	++	+++
141. "			++	++	-	+++	+++	++	+	+	-	+	+	+	+++	+	-	+++	-	-	+++	++	-	++	+++
142. "			+	+	-	++	+++	++	+	-	-	+	+	-	+++	+	-	+++	-	-	+++	++	-	++	+++
143. "			+	+	-	++	+++	++	+	-	-	+	+	-	+++	++	-	+++	-	-	+++	++	-	++	+++
144. "			+	+	-	++	+++	++	+	-	-	+	+	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
145. "			+	+	-	++	+++	++	+	-	-	++	+	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
146. "			+	+	-	++	+++	++	+	-	-	++	+	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
147. "			+	+	-	++	+++	++	+	-	-	++	+	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
148. "			+	+	-	++	+++	++	+	+	-	++	++	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
149. "			+	+	-	++	+++	++	+	+	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
150. "			+	+	-	++	+++	++	+	+	++	+++	++	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
151. Tag	+	+	-	++	+++	++	+	+	++	+++	++	-	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
152. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	-	+++	-	++	+++	+	-	++	+++
153. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	-	+++	-	++	+++	+	-	++	+++
154. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	-	+++	-	++	+++	-	-	++	+++
155. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	-	+++	-	++	+++	-	-	++	+++
156. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	+	+++	-	++	+++	-	-	+++	+++
157. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
158. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
159. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
160. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
161. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
162. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
163. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
164. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	++	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
165. "	+	+	+	++	+++	+	++	+	++	+	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
166. "			+	++	+++	+	+++	+	++	+	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
167. "			+	++	+++	++	+++	+	++	+	++	-	++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
168. "			+	++	+++	++	+++	+	++	+	++	-	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
169. "			+	++	+++	++	+++	+	++	+	++	-	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
170. "			+	++	+++	++	+++	+	++	-	++	-	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
171. "			+	++	+++	+	+++	+	++	-	++	-	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
172. "			+	++	+++	+	++	+	++	-	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
173. "				++	+++	+	++	+	++	-	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
174. "				++	+++	+	++	+	++	-	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
175. "				++	++	+	++	-	++	-	++	-	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
176. "				++	++	+	++	-	++	+	++	-	+++	++	+	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
177. "				+	++	+	++	-	++	+	+++	++	+++	++	+	+++	-	++	+++	+	++	+++	+++
178. "				+	++	+	++	-	++	+	+++	++	+++	+++	++++	+++	-	++	+++	+	++	+++	+++
179. "				+	++	+	++	-	+	+	+++	++	+++	+++	++++	+++	-	++	+++	+	++	+++	+++
180. "				+	++	+	++	-	+	+	+++	++	+++	+++	++++	+++	-	++	+++	++	++	+++	+++

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
151. Tag	+	+	-	++	+++	++	+	+	++	+++	++
152. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
153. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
154. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
155. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
156. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
157. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
158. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
159. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
160. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
161. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
162. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	+++	++
163. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	++	++
164. "	+	+	-	++	+++	+	++	+	++	++	++
165. "	+	+	+	++	+++	+	++	+	++	+	++
166. "			+	++	+++	+	+++	+	++	+	++
167. "			+	++	+++	++	+++	+	++	+	++
168. "			+	++	+++	++	+++	+	++	+	++
169. "			+	++	+++	++	+++	+	++	+	++
170. "			+	++	+++	++	+++	+	++	-	++
171. "			+	++	+++	+	+++	+	++	-	++
172. "			+	++	+++	+	++	+	++	-	++
173. "				++	+++	+	++	+	++	-	++
174. "				++	+++	+	++	+	++	-	++
175. "				++	++	+	++	-	++	-	++
176. "				++	++	+	++	-	++	+	++
177. "				+	++	+	++	-	++	+	+++
178. "				+	++	+	++	-	++	+	+++
179. "				+	++	+	++	-	+	+	+++
180. "				+	++	+	++	-	+	+	+++

3	34	35	36	37	29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
	+++	++	-	+++	-	+	+++	++	-	++	+++
	+++	++	-	+++	-	++	+++	+	-	++	+++
	+++	++	-	+++	-	++	+++	+	-	++	+++
	+++	++	-	+++	-	++	+++	-	-	++	+++
	+++	++	-	+++	-	++	+++	-	-	++	+++
	+++	++	+	+++	-	++	+++	-	-	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
	++	++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	+++	++	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++
	+++	++	+	+++	-	++	+++	-	++	+++	+++
	+++	++	+	+++	-	++	+++	+	++	+++	+++
	+++	+++	++++	+++	-	++	+++	+	++	+++	+++
	+++	+++	++++	+++	-	++	+++	+	++	+++	+++
	+++	+++	++++	+++	-	++	+++	++	++	+++	+++

	25	26	27	28	29	30	31	32	33
181. Tag	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
182. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
183. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
184. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
185. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
186. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
187. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
188. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
189. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
190. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
191. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
192. "	+	++	+	++	-	+	+	+++	++
193. "		++	+	++	-	+	+	+++	-
194. "		++	+	++	-	+	+	+++	-
195. "		++	+	++	-	+	++	+++	-
196. "		++	+	++	-	+	+++	+++	-
197. "		++	+	++	-	+	+++	++	-
198. "		+	+	++	-	+	+++	++	-
199. "		+	+	++	+	+	+++	++	-
200. "		+	+	++	+	+	++	++	-
201. "		+	+	++	+	+	++	++	-
201. "		+	+	++	+	+	++	++	-
202. "		+	+	++	+	+	++	++	-
203. "			+	++	+	+	++	++	-
204. "			+	++	+	+	++	++	-
205. "			+	++	+	+	++	++	-
206. "			+	++	+	+	++	++	-
207. "			+	++	+	+	++	++	-
208. "			+	++	+	+	++	++	-
209. "			+	++	+	+	++	++	-
210. "			+	++	+	+	++	++	-

34	35	36	37
+	+++	+++	+++
+	+++	+++	+++
+	+++	+++	+++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	++
+	+++	+++	+++
+	+++	+++	+++
+	+++	++	+++
+	+++	++	+++
+	+++	++	+++
+	+++	++	+++
+	+++	++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++
+	++	+++	+++

29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
-	++	+++	++	++	+++	+++
-	++	+++	++	++	+++	+++
-	++	+++	++	++	+++	+++
-	++	++	++	++	+++	+++
-	++	++	++	++	+++	+++
+	++	++	++	++	+++	+++
+	++	++	++	++	+++	+++
+	++	++	++	+++	+++	+++
+	++	++	++	+++	+++	+++
+	++	++	++	+++	+++	+++
+	+	++	++	+++	+++	+++
+	+	++	++	+++	+++	+++
+	+	++	++	+++	+++	+++
+	+	++	++	+++	+++	+++
+	+	++	++	+++	+++	+++
+	+	++	++	+++	++	+++
+	+	++	+	+++	++	+++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	++	++
+	+	++	+	+++	+++	++
+	+	++	+	+++	+++	++

	27	28	29	30	31	32	33	34	35
211. Tag	+	++	+	+	++	++	-	+++	++
212. "		++	+	+	++	++	-	+++	++
213. "		++	+	+	++	++	-	+++	++
214. "		++	-	+	++	++	+	+++	+++
215. "		++	-	-	++	++	++	+++	+++
216. "		++	-	-	++	++	++	+++	+++
217. "		++	-	-	++	++	++	+++	+++
218. "		++	-	-	++	++	++	+++	+++
219. "		++	-	-	++	++	++	+++	+++
220. "		++	-	-	++	++	++	+++	+++
221. "		++	-	-	+	++	++	+++	+++
222. "		++	-	-	+	++	++	+++	+++
223. "		++	-	-	+	++	++	+++	+++
224. "		++	-	-	+	++	++	+++	+++
225. "		++	-	-	+	++	++	+++	+++
226. "		++	-	-	+	++	++	++	+++
227. "			-	-	+	++	++	++	+++
228. "			-	-	+	++	++	++	+++
229. "			-	-	+	++	++	++	+++
230. "			-	-	+	++	++	++	+++
231. "			-	-	+	++	++	++	+++
232. "			-	-	+	++	++	++	+++
233. "			-	-	+	++	++	++	+++
234. "			-	-	+	++	++	++	+++
235. "			-	-	+	++	++	++	+++
236. "			-	-	+	++	++	++	+++
237. "			-	-	+	++	++	++	+++
238. "			-	-	+	++	++	++	+++
239. "			-	-	+	++	++	++	+++
240. "			-	-	+	++	++	++	+++

36	37	29a	30a	32a	33a	35a	36a	37a
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	+	++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	++	+++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	++	+++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	++	+++	+++	++
+++	+++	+	+	+++	++	+++	++++	+
+++	+++	+	+	+++	++	+++	++++	+
+++	+++	++	+	++++	++	+++	++++	-
+++	+++	++		++++	++	+++	+++	-
+++	+++	++		++++	++	+++	+++	-
+++	+++	++		++++	++	+++	+++	-

	29	30	31	32	33	34	35	36	37	29a	32a	33a	35a	36a	37a
241. Tag	-	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	-
242. "	-	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	-
243. "	-	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	++	++++	++	+++	+++	-
244. "	-	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++++	++	+++	+++	-
245. "	-	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++	+++	+++	-
246. "	-	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++	+++	+++	-
247. "	-	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	+++	++	+++	+++	-
248. "	+	+	+	+++	++	++	+++	++	++++	+++	+++	++	++	+++	-
249. "	+	+	+	+++	++	++	+++	++	++++	+++	+++	++	++	+++	-
250. "	+	+	+	+++	++	++	++	++	++++	+++	+++	++	++	+++	-
251. "	+	+	+	+++	++	++	++	++	++++	+++	+++	++	++	+++	-
252. "	+	+	+	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	-
253. "	+	+	+	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	++	+++	-
254. "	+	+	+	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	++	+++	-
255. "	+	+	+	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	++	+++	-
256. "	+	+	+	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	++	+++	-
257. "	+	+	+	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	+	+++	-
258. "	+	+	+	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	+	+++	-
259. "	+	+	+	+++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	+	+++	-
260. "		+	+	++	+	++	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	-
261. "		+	+	++	+	++	+	+++	++	+++	+++	++	+	+++	-
262. "		+	+	++	+	+	+	+++	++	+++	+++	++	+	++	-
263. "			+	++	+	+	+	+++	++	++	+++	++	+	++	-
264. "			+	++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	+	++	-
265. "			+	++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
266. "				++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
267. "				++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
268. "				++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
269. "				++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
270. "				++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-

	32	33	34	35	36	37	29a	32a	33a	35a	36a	37a
271, Tag	++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
272. "	++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
273. "	++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
274. "	++	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
275. "	+	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
276. "		+	+	+	+++	++	++	+++	+++	-	++	-
277. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	-
278. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	-
279. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	-
280. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	-
281. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	-
282. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	+
283. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	+
284. "		+	++	+	+++	++	+	++	++	-	++	+
285. "		++	++	+	+++	++	+	++	++	+	++	+
286. "		++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
287. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
288. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
289. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
290. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
291. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
292. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
293. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
294. "		+++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+
295. "		+++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
296. "		+++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
297. "		+++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
298. "		+++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
299. "		++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
300. "		++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+

	33	34	35	36	37	29a	32a	33a	35a	36a	37a
301. Tag	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+
302. "	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
303. "	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
304. "	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
305. "	++	+	++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+
306. "	++	+	++	+++	+++	++	++	++	++	+++	-
307. "	++	+	++	+++	+++	++	+	++	++	+++	-
308. "	++	+	++	+++	+++	++	+	++	+	+++	-
309. "	++	+	++	+++	+++	++	+	++	+	+++	-
310. "	++	+	++	+++	+++	++	+	++	-	+++	-
311. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
312. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
313. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
314. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
315. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
316. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
317. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
318. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	-
319. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	+
320. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	+
321. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	+
322. "	++	+	++	+++	+++	+	+	++	-	+++	+
323. "	++	+	++	+++	+++	+	+	+++	-	+++	+
324. "	++	+	++	+++	+++	+	+	+++	-	+++	+
325. "	++	+	++	+++	+++	+	+	+++	-	+++	++
326. "	++	+	++	+++	+++	+		+++	++	+++	++
327. "	++	+	++	+++	+++	++		+++	++	+++	++
328. "	++	+	++	+++	+++	++		+++	++	+++	++
329. "	++	+	++	+++	+++	++		+++	++	+++	++
330. "	++	+	++	+++	+++	++		+++	++	+++	++

	33	34	35	36	37	29a	33a	35a	36a	37a
331. Tag	++	+	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
332. "	++	+	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
333. "	++	+	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
334. "	++	+	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
335. "	++	+	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
336. "	++	+	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
337. "	++	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
338. "	++	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
339. "	++	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
340. "	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
341. "	+	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++	++
342. "	+	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++	++
343. "	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
344. "	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
345. "	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++
346. "	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++
347. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
348. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
349. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
350. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
351. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
352. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
353. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
354. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	++	++
355. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++
356. "	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++
357. "	+	+	++	+++	++	++	++	+++	+++	++
358. "	+	+	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++
359. "	+	+	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++
360. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++

	33	34	35	36	37	29a	33a	35a	36a	37a
361. Tag	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
362. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
363. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
364. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
365. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
366. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
367. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
368. "	+	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
369. "	++	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
370. "	++	+	+	++	++	+	+++	+++	+++	++
371. "	++	+	+	++	++	+	+++	+++	+++	++
372. "	++	+	+	++	++	+	+++	+++	+++	++
373. "	++	+	+	++	++	+	+++	+++	+++	++
374. "	++	+	+	++	++	+	+++	+++	+++	++
375. "	++	+	+	++	++	+	+++	++	+++	++
376. "	++	+	+	++	++	+	+++	++	+++	++
377. "	++	+	+	++	++	+	+++	++	+++	++
378. "	++	+	+	++	++	+	+++	+	+++	++
379. "	++	+	+	++	++	+	+++	+	++	+
380. "	++	+	+	++	++	+	+++	+	++	+
381. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
382. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
383. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
384. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
385. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
386. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
387. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
388. "	++	+	+	++	++	-	+++	+	++	+
389. "	++	+	+	+++	++	-	+++	++	++	+
390. "	++	+	+	+++	++	-	+++	++	++	+

		33	34	35	36	37		29a	33a	35a	36a	37a
391.	Tag	++	+	++	+++	++		-	+++	++	++	+
392.	"	++	+	++	+++	++		-	+++	++	++	+
393.	"	+	+	++	+++	++		+	+++	++	++	++
394.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
395.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
396.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
397.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
398.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
399.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
400.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
401.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
402.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
403.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
404.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	++	++
405.	"	+	+	++	+++	++		++	+++	++	+	++
406.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++	+	++
407.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++	+	++
408.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
409.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
410.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
411.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
412.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
413.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
414.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
415.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
416.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
417.	"	+	+	+	++	++		++	+++	++		++
418.	"	+	+	+	++	++		++	++	++		++
419.	"	+	+	+	++	++		++	++	++		++
420.	"	+	+	+	++	++		++	++	++		++

	33	34	35	36	37	29a	33a	35a	37a
421. Tag	+	+	+	++	++	++	++	++	++
422. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
423. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
424. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
425. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
426. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
427. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
428. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
429. "	+	+	+	++	++	++	++	++	++
430. "	+	+	++	++	++	++	++	++	++
431. "	+	+	++	++	+	++	++	++	++
432. "	+	+	++	++	+	++	++	++	++
433. "	+	+	++	++	+	++	++	++	++
434. "	+	+	++	++	+	+	++	++	++
435. "	+	+	++	++	+	+	+++	++	++
436. "	+	+	++	++	+	+	+++	++	++
437. "	+	+	++	++	+		+++	++	++
438. "	++	+	++	++	+		+++	++	++
439. "	++	+	++	++	+		++	++	++
440. "	++	+	++	+++	+++		++	++	++
441. "	++	+	++	+++	+++		++	++	+
442. "	++	+	++	+++	+++		++	++	+
443. "	++	+	++	+++	+++		+++	++	+
444. "	++	+	++	+++	+++		+++	++	+
445. "	++	+	++	+++	+++		+++	++	+
446. "	++	+	++	+++	+++		+++	++	+
447. "	++	+	++	+++	+++		+++	++	+
448. "	++	+	++	+++	+++		+++	++	+
449. "	++	+	++	+++	+++		+++	++	+
450. "	++	+	++	+++	++		+++	++	+

	33	34	35	36	37	33a	35a	37a
451. Tag	++	+	++	+++	++	+++	++	+
452. "	++	+	++	++	++	+++	++	++
453. "	+	+	+	++	++	+++	++	++
454. "	+	+	+	++	++	++	++	++
455. "	+	+	+	++	+++	++	++	++
456. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
457. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
458. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
459. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
460. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
461. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
462. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
463. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
464. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
465. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
466. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
467. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
468. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
469. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
470. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
471. "	+	+	+	+++	+++	++	++	++
472. "	+	+	+	+++	++	++	++	++
473. "	+	+	+	++	++	++	++	++
474. "	+	+	+	++	++	++	++	++
475. "	+	+	+	++	++	++	++	++
476. "	+	+	+	++	++	++	++	++
477. "	+	+	+	++	++	++	++	++
478. "	+	+	+	+++	++	++	+	++
479. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
480. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++

	33	34	35	36	37	33a	35a	37a
481. Tag	+	+	+	+++	+++	++	+	++
482. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
483. "	+	+	+	+++	+++	++	+	++
484. "	+	+	++	+++	+++	++	+	++
485. "	+	+	++	+++	+++	++	+	++
486. "	+	+	++	+++	+++	++	+	++
487. "	+	+	++	+++	+++	+	+	++
488. "	+	+	++	+++	+++	+	+	+
489. "	+	+	++	+++	+++	+	+	+
490. "	+	+	++	+++	+++	+	+	+
491. "	+	+	++	+++	+++	+	+	+
492. "	+	+	++	+++	+++	+	+	+
493. "	+	-	++	+++	+++	+	+	+
494. "	+	-	++	+++	+++	+	+	+
495. "	+	-	++	+++	+++	+	+	+
496. "	+	+	++	+++	+++	+	+	+
497. "	+	+	++	+++	+++	+	+	+
498. "	+	-	++	+++	+++	+	+	+
499. "	+	-	++	+++	+++	+		+
500. "	+	-	++	+++	+++	+		+
501. "	+	-	++	+++	+++	+		+
502. "	+	+	++	+++	+++	+		+
503. "	+	+	++	+++	+++	+		+
504. "	+	+	++	+++	+++	+		+
505. "	+	+	++	+++	+++	+		+
506. "	+	+	++	+++	+++	+		+
507. "	+	+	++	+++	+++	+		+
508. "	+	+	++	+++	+++	+		+
509. "	+	+	++	+++	+++	+		+
510. "	+	+	++	+++	+++	+		+

	33	34	35	36	37	37a
511. Tag	+	+	++	+++	+++	+
512. "	+	+	++	+++	+++	+
513. "	+	+	++	+++	+++	+
514. "	+	+	++	+++	+++	+
515. "	+	+	++	+++	+++	+
516. "	+	+	++	+++	+++	+
517. "	+	+	++	+++	+++	+
518. "	+	-	++	+++	+++	+
519. "	+	-	++	+++	+++	+
520. "	+	+	++	+++	+++	+
521. "	+	+	++	+++	+++	+
522. "	+	+	++	+++	+++	+
523. "	+	+	++	+++	+++	+
524. "	+	+	++	+++	+++	+
525. "	+	+	++	+++	+++	+
526. "	+	-	++	+++	+++	+
527. "	+	-	++	+++	+++	+
528. "	+	-	++	+++	+++	+
529. "	+	-	++	+++	+++	+
530. "	+	-	++	+++	+++	+
531. "	+	-	++	+++	+++	+
532. "	+	-	++	+++	+++	+
533. "	+	-	++	+++	+++	+
534. "	+	-	++	+++	+++	+
535. "	+	-	++	+++	+++	+
536. "	+	-	+	+++	+++	+
537. "	+	-	+	+++	+++	+
538. "	+	-	+	+++	+++	+
539. "	+	-	+	+++	+++	+
540. "	+	-	+	+++	+++	+

	33	34	35	36	37	37a
541. Tag	+	+	+	+++	+++	+
542. "	+	+	+	+++	+++	+
543. "	+	+	+	+++	+++	+
544. "	+	+	+	+++	++	+
545. "	+	+	+	+++	++	+
546. "	+	+	+	+++	++	+
547. "	+	+	+	+++	++	+
548. "	+	+	+	+++	++	+
549. "	+	+	+	++	++	+
550. "	+	+	+	++	++	+
551. "	+	+	+	++	++	+
552. "	+	+	+	++	++	+
553. "	+	+	+	++	++	+
554. "	+	+	+	++	++	+
555. "	+	+	+	++	++	+
556. "	+	+	+	++	++	+
557. "	-	+	+	++	++	+
558. "	-	+	+	++	++	+
559. "	-	+	+	++	++	+
560. "	-	+	+	++	++	-
561. "	-	+	+	++	++	-
562. "	-	+	+	++	++	-
563. "	-	+	+	++	++	-
564. "	-	+	+	++	++	-
565. "	-	+	-	++	++	-
566. "	-	+	-	+	++	-
567. "	-		-	+	++	-
568. "	-		-	+	++	-
569. "	-		-	+	++	+
570. "	-		-	+	++	+

		33	35	36	37		37a
571.	Tag	+	+	++	+++		++
572.	"	+	+	++	+++		++
573.	"	+	+	++	+++		++
574.	"	+	+	++	+++		++
575.	"	+	+	++	+++		++
576.	"	+	+	++	+++		++
577.	"	+	+	++	+++		++
578.	"	+	+	++	+++		++
579.	"	+	+	++	+++		++
580.	"	+	+	++	+++		++
581.	"	+	+	++	+++		++
582.	"	+	+	++	+++		++
583.	"	+	+	++	+++		++
584.	"	+	+	++	+++		++
585.	"	+	+	++	+++		++
586.	"	+	+	++	+++		++
587.	"	+	+	++	+++		++
588.	"	+	+	++	+++		++
589.	"	+	+	++	+++		++
590.	"	+	+	++	+++		++
591.	"	+	+	++	+++		++
592.	"	+	+	++	+++		++
593.	"	+	+	++	+++		++
594.	"	+	+	++	+++		++
595.	"	+	+	++	+++		++
596.	"	+	+	++	+++		++
597.	"	+	+	++	+++		++
598.	"	+	+	++	+++		++
599.	"	+	+	++	+++		++
600.	"	+	+	++	+++		++

	33	35	36	37	37a
601. Tag	+	+	++	+++	++
602. "	+	+	++	+++	++
603. "	+	+	++	+++	++
604. "	+	+	++	+++	++
605. "	+	+	++	+++	++
606. "	+	+	++	+++	++
607. "	+	+	++	+++	++
608. "	+	+	++	+++	++
609. "	+	+	++	+++	++
610. "	+	+	++	+++	++
611. "	+	+	++	+++	++
612. "	+	+	++	+++	++
613. "	+	+	++	+++	++
614. "	+	+	++	+++	++
615. "	+	+	++	+++	++
616. "	+	+	++	+++	++
617. "	+	+	++	+++	++
618. "	+	+	++	+++	++
619. "	+	+	++	+++	++
620. "	+	+	++	+++	++
621. "	+	+	++	+++	++
622. "	+	+	++	+++	++
623. "	+	+	+	++	++
624. "	+	+	+	++	
625. "	+	+	+	++	
626. "	+	+	+	++	
627. "	+	+	+	++	
628. "	+	+	+	++	
629. "	+	+	+	++	
630. "	+	+	+	++	

	33	35	36	37
631. Tag	+	+	+	++
632. "	+	+	+	++
633. "	+	+	+	++
634. "	+	+	+	++
635. "	+	+	+	++
636. "	+	+	+	++
637. "	+	+	+	++
638. "	+	+	+	++
639. "	+	+	+	++
640. "	+	+	+	++
641. "	+		+	++
642. "	+		+	+
643. "	+		+	+
644. "	+		+	
645. "	+		+	
646. "	+		+	
647. "	+		+	
648. "	+		+	
649. "	+		+	
650. "	+		+	
651. "	+		+	
652. "	+		+	
653. "	+		+	
654. "	+		+	
655. "	+		+	
656. "	+		+	
657. "	+		+	
658. "	+		+	
659. "	+			
660. "	+			

	33
661. Tag	+
662. "	+
663. "	+
664. "	+
665. "	+
666. "	+
667. "	+
668. "	+
669. "	+
670. "	+
671. "	+
672. "	+
673. "	+
674. "	+
675. "	+

Mit Achromobacter Fischeri.

hromobacter Fischeri zeigte auf Schrägagarröhrchen mit Fisch-
hrboden ein wesentlich stärkeres und bedeutend längeres Leuch-
n als Photobacterium phosphoreum.

. Gemeinschaft mit einzelnen Pilzstämmen in flüssiger synthetischer Nährlösung war diese stark erhöhte Leuchtkraft nach ungefähr vierzehn Tagen etwas abgeschwächt. Das Leuchten der Pilzkterien Kulturen verlief aber noch weitere sechs Wochen günstiger als das der Pilz-Photobacterium phosphoreum Kulturen. Von esem Zeitpunkt an, also acht Wochen nach Beimpfen mit Leuchtkterien, zeigten sich bei den Kulturen mit Achromobacter keine sseren Leuchtwerte mehr als bei den Kulturen mit Photobacteum phophoreum. Das Leuchten der Achromobacter-Kulturen mit Pilen war bereits nach zweihundertneunundzwanzig Tagen bei allen meinschaftskulturen beendet, mit Ausnahme der Kultur mit u s a r i u m o x y s p o r u m 14, die nach weiteren fünfunddreißig gen erneut ein schwaches Leuchten erkennen ließ. Aus Platzmanl wurde diesesmal nur mit vier Pilzstämmen gearbeitet und zwar:

Fusarium graminearum	Fusarium oxysporum 14
Fusarium semitectum	Fusarium oxysporum 7

Das Leuchten auf Kulturfiltrat einiger Fusarien und deren Mycel (getrennt untersucht).

s wurden Versuche angestellt, bei denen nach erfolgter Pilzkulur das Mycel und das Nährlösungsfiltrat getrennt und abgestuft er synthetischen Bakteriennährlösung zugesetzt wurden.
ilzkulturen, die mindestens zweiundzwanzig Tage gut auf dem lüssigen synthetischen Nährmedium gewachsen waren, wurden hierı verwendet. Die Nährlösung wurde durch ein Seitz-Bakterienfilter eschickt und abgestuft der synthetischen Lösung zugesetzt, die

sodann mit Bakterien beimpft wurde. Das Mycel wurde mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen und mit Filtrierpapier abgetrocknet, bis es keine Feuchtigkeit mehr hinterließ. Es wurde je ein Gramm Mycel verwendet. Dieses Mycel wurde mindestens eine halbe Stunde mit Quarzsand unter ständigem Schaben in einem rauhen Mörser verrieben. Das dann mit der synthetischen Nährlösung angeriebene Mycel wurde zentrifugiert und auf einem Seitz-Bakterienfilter mittels einer Öldruckpumpe abgenutscht. Das Mycelfiltrat wurde abgestuft dem synthetischen Medium zugesetzt.

Die Abstufungen waren folgende:

1.)	Mycelfiltrat	16 ccm
2.)	Mycelfiltrat	8 ccm
	Nährmedium	ad 16 ccm
3.)	Mycelfiltrat	4 ccm
	Nährmedium	ad 16 ccm

desgleichen vom Kulturfiltrat:

1.)	Kulturfiltrat	16 ccm
2.)	Kulturfiltrat	8 ccm
	Nährmedium	ad 16 ccm
3.)	Kulturfiltrat	4 ccm
	Nährmedium	ad 16 ccm

Zum jeweiligen Vergleich setzte ich jedesmal 16 ccm frische synthetische Nährlösung an.

Die so beschickten Kolben wurden mit vierundzwanzig Stunden altem Photobacterium phosphoreum beimpft. Die erste Messung erfolgte vierundzwanzig Stunden nach Beimpfung, alsdann jede weitere Messung im gleichen Zeitabschnitt.
Die Leuchtwerte sind in Tabelle 3 Seite 17 aufgeführt.

Die Versuche ergaben:

Filtrat und Mycel der Fusarium culmorum-, Fusarium nivale-,

Tabelle 3

Tabelle über Beschleunigung und Verzögerung des Nachlassens der Leuchtstärke bei den getrennten Mycel- und Kulturfiltratversuchen (in den zuvor angegebenen Mischungsverhältnissen entsprechend Seite 16: 1.), 2.), 3.) und Vergleich: Bakterien allein in synthetischer Nährlösung). Die Zahlen geben relative Leuchtwerte an, die mit der Apparatur entsprechend Seite 6 und 7 festgestellt wurden.

	1. Tag			2. Tag			3.
	Bakt. allein	Filtr.	Mycel	Bakt. allein	Filtr.	Mycel	Bakt. allein	Fi
1.) Fusarium oxysporum 14	29	21	15	15	9	15	3	
Fusarium oxysporum 7	35	25	20	29	15	15	15	
Fusarium nivale	29	17		15			3	
Fusarium culmorum	33	15	15	33	5	17	17	
Fusarium Erde	29	25	4	15			3	
2.) Fusarium oxysporum 14	29	19	24	15	33	4	3	
Fusarium oxysporum 7	35	35	34	23	30	21	15	
Fusarium nivale	29	33	21	15	23	15	3	
Fusarium culmorum	33	33	22	33	27	16	17	
Fusarium Erde	23	35	31	15	12	4	3	
3.) Fusarium oxysporum 14	29	23	23	15	27	15	3	
Fusarium oxysporum 7	35	35	35	29	30	27	15	
Fusarium nivale	29	31	24	15	17	20	3	
Fusarium culmorum	33	33	22	33	33	17	17	
Fusarium Erde	29	23	33	15	13	4	3	

ag		4. Tag			5. Tag			6, Tag		
r.	Mycel	Bakt. allein	Filtr.	Mycel	Bakt. allein	Filtr.	Mycel	Bkt. allein	Filtr.	Mycel
	10			4			1			
	12			10			3			
	4									
	15			5						
	3		16	3		8				
	11		12	4		4				
	5		4	2						
	8		17	4		10			3	
	1									
	4		4	4						
	17		13	8		4				
	10			3						
	13		13	4		6			4	
	1									

Fusarium oxysporum 7- und Fusarium oxysporum 14- Stämme verzögerten das Nachlassen des Leuchtens. Fusarium "Erde" hingegen beschleunigte das Nachlassen des Leuchtens. Relativ günstig verliefen die Verdünnungen der Zusätze, besser als reines Filtrat beziehungsweise Mycelextrakt.[1)]

Der Kolbeninhalt hatte vor dem Beimpfen einen pH-Wert von 6,8 bis 7,0, gemessen mit MERCK' schem Indikatorpapier.

D. Die pH-Bedingtheit des Leuchtens.

a) Methode zur sterilen Entnahme.

Bei pH-Meßversuchen, die an acht verschiedenen Fusarienstämmen durchgeführt wurden, zeigte sich, daß das Leuchten wahrscheinlich infolge Rauchgasentwicklung am Stopfen beim Abflammen viel früher, bereits nach fünfundneunzig Tagen mit Ausnahme des Fusarienstammes "x" beendet war. Fusarium "x" leuchtete einhundertneun Tage. Auffallend war, daß das Leuchten der einzelnen Stämme bei einem niedereren pH-Wert als sonst beendet war. Nachstehend die einzelnen pH-Werte, die sich mit Abflammethode geöffneten Kolben ergaben:

Fusarium oxysporum 14 bei pH 7,90 nach 105 Tagen
Fusarium oxysporum 7 bei pH 8,08 nach 105 Tagen
Fusarium lycopersicum bei pH 7,72 nach 105 Tagen
Fusarium semitectum bei pH 7,88 nach 105 Tagen

---

1) (Die Augen werden durch die vielen täglichen Messungen im Dunkeln derartig beansprucht, daß eine ständige Vitamin-A-Einnahme zu empfehlen ist. Das Tragen einer guten Sonnenbrille, besonders bei Schneelage, erwies sich als vorteilhaft. An ganz hellen Sommertagen war es außerdem günstig, die Messungen in die späten Abendstunden zu verlegen.)

Fusarium culmorum	bei pH 7,65 nach 105 Tagen
Fusarium "orchis"	bei pH 7,45 nach 105 Tagen
Fusarium "Erde"	bei pH 7,85 nach 105 Tagen
Fusarium "x"	bei pH 7,82 nach 123 Tagen

Die Reaktion bei Beendigung des Leuchtens ungeöffneter Kolben lagen zu einem viel späteren Zeitpunkt bei folgenden Werten:

Fusarium oxysporum 14	bei pH 8,34 nach 421 Tagen
Fusarium oxysporum 7	bei pH 8,50 nach 635 Tagen
Fusarium lycopersicum	bei pH 8,67 nach 289 Tagen
Fusarium semitectum	bei pH 8,23 nach 574 Tagen
Fusarium culmorum	bei pH 8,55 nach 206 Tagen
Fusarium "orchis"	bei pH 8,63 nach 512 Tagen
Fusarium "Erde"	bei pH 8,35 nach 276 Tagen

Diese Werte wurden zwei Wochen nach Beendigung der Leuchtprozesse gemessen.

Trotz Berücksichtigung der Verschiebung des Mengenverhältnisses durch Entnahme aus den Kolben schien mir die Abflammethode ungeeignet, zumal Ersatzkolben, die nie geöffnet wurden, ein viel längeres Leuchten zeigten. Es war wohl unbedingt erforderlich, die Kolben bei der Entnahme nicht mehr zu öffnen.

Als bestes Verfahren erwies sich die Probenentnahme mittels einer starken und sehr langen Injektionsnadel, die auf eine Recordspritze aufgesetzt wurde. Für diese Arbeitsweise mußten in erster Linie die Stopfen der Kolben geeignet sein. Denn beim Durchstich, der gut möglich sein mußte, durfte weder Watte noch Zellstoff mitgerissen werden. Ich wählte vorzugsweise Erlenmeyerkolben mit engem Hals, um den Stopfen einen guten Halt zu gewähren. Der Kern aus Zellstoff und die Watte wurden so gewickelt, daß die Nadel mit einigem Druck gut durchging. Um das Mitreißen von Watte und Zellstoff zu verhindern, wurde jeder Stopfen mit einigen Lagen Mull umgeben, der über dem Stopfen fest verknotet wurde, damit der Mull nicht abrutschen konnte. Jeder Stopfen wurde auf seine Eignung geprüft und in den meisten Fällen mehrere Male umgearbeitet.

Es erwies sich beim Einstechen als günstig, den Mullknoten festzuhalten, um ein Entweichen des Stopfens in das Kolbeninnere infolge des aufgewandten Druckes zu verhindern. Nach Entnahme wurde die Einstichstelle immer etwas zusammengedrückt. Vor jeder einzelnen Entnahme wurden Spritze und Nadel sterilisiert.

Diese Methode erwies sich als überaus sicher, wenn auch sehr zeitraubend. Es trat niemals eine Fremdinfektion auf. Der Leuchtprozeß blieb ungestört.

b) pH-Verhältnisse bei Gemeinschaft von Bakterien und Pilzen.

Die zweijährigen Leuchtbeobachtungsreihen mit Pilzstämmen und Bacterium phosphoreum zeigten ständig unterschiedliche Leuchtwerte. Es gab immer wieder Tage, an denen bei den gemeinschaftlichen Bakterien-Fusarienkulturen gar kein Leuchten wahrnehmbar war.
In Serienmessungen konnte die Änderung im pH-Verlauf deutlich festgestellt werden. Jede pH-Messung erforderte 1 ccm Kulturflüssigkeit. Meiner Ansicht nach genügen die regelmäßigen Messungen über vier Monate, um einen klaren Verlauf der pH-Werte zu erkennen. Weitere Messungen, die nach achtwöchiger Pause nochmals über sechs Wochen aus den gleichen Versuchsreihen fortgesetzt wurden, verliefen alle mit nur ganz geringen Schwankungen. Der größte und der kleinste pH-Wert dieser zweiundvierzig späteren Tage nach der Meßpause lagen bei allen drei Kulturen nicht mehr als 0,35 pH-Einheiten auseinander. Am Ende des Leuchtprozesses wurden die pH-Werte nochmals festgestellt. Beim Überprüfen der pH-Verhältnisse an drei Fusarienstämmen erkannte ich folgendes:

> F u s a r i u m o x y s p o r u m 7 ermöglichte die größte Bakterien-Leuchtstärke bei pH 7,75. Am zwölften Tag war der niedrigste pH-Wert mit 5,80 bei mäßigem Leuchten erreicht und am neununddreißigsten Tag der erste höchste

Wert mit pH 7,92 bei gutem Leuchten. Beim Einstellen des Leuchtens nach sechshunderteinundzwanzig Tagen war der pH-Wert 8,50.

F u s a r i u m "o r c h i s" ergab die größte Bakterien-Leuchtstärke erstmalig bei pH 7,72, diese hielt aber bei einem Absinken des pH-Wertes auf 7,20 an. Später lag die größte Leuchtstärke bei pH 7,48. Der niedrigste pH-Wert war am zwölften Tag bei mäßigem Leuchten mit pH 5,68 erreicht. Der erste höchste Wert war pH 7,82 bei sehr gutem Leuchten. Nach Beendigung des Leuchtens nach vierhundertachtundneunzig Tagen betrug der pH-Wert 8,63.

Bakterienkulturen mit F u s a r i u m s e m i t e c t u m zeigten einen öfteren Wechsel zwischen Leuchten und Nichtleuchten. Am vierzehnten Tag war ein erstmalig niedriger pH-Wert von 5,50 erreicht, wobei ich kein Leuchten mehr wahrnehmen konnte, Am zweiunddreißigsten Tag war mit dem ersten pH-Höchstwert von 7,20 ein sehr gutes Leuchten erzielt. Der höchste Leuchtwert wurde jedoch erst später bei pH 7,50 erreicht. Der pH-Wert beim Einstellen des Leuchtens nach fünfhundertundzehn Tagen war 8,23.

Die Nährlösungen wurden bei pH 8,20 mit den einzelnen Pilzstämmen beimpft. Nach durchschnittlich vier Tagen waren die Pilzstämme so weit, daß die Bakterien dazu geimpft werden konnten. Tabelle 4 Seite 23 zeigt den Verlauf der pH- und der Leuchtwerte. Die pH-Werte sind getrennt für gemeinschaftliche Pilzbakterienkulturen und für Pilzkulturen allein aufgeführt.

c) pH-Verhältnisse bei Pilzstämmen allein.

Während Photobacterium phosphoreum und Pilzstamm in gemeinsamer Nährlösung pH-Spannen von 8,63 bis 4,90 aufwiesen, lagen die pH-Verhältnisse bei den Pilzstämmen allein wesentlich anders. Die aufgeführten Pilzstämme, bei pH 8,20 eingeimpft und ohne Bakteriengemeinschaft gewachsen, entwickelten sich bei folgenden pH-Spannen:

Fusarium oxysporum 7 von 8,20 bis 7,72
Fusarium "orchis" von 8,20 bis 7,90
Fusarium semitectum von 8,20 bis 7,85

Der genaue Verlauf der pH-Werte ist in Tabelle 4 Seite 23 zu ersehen.

d) pH-Verhältnisse bei Bakterienkulturen mit Chemikalienzusatz.

Interessant waren die Vergleiche dieser pH-Werte bei Leuchthöchstwerten der Pilz-Bakteriengemeinschaften zu jenen die mit chemischen Substanzzusätzen zu Photobacterium phosphoreum erzielt wurden.
Wie auch schon BUKATSCH und SIX feststellten, liegen die Leuchthöchstwerte der Versuche in synthetischer Nährlösung mit und ohne Zusätze durchweg bei pH 6,70. Bei den gemeinschaftlichen Pilz-Bakteriennährlösungen wurden Leuchthöchstwerte bei folgenden pH-Werten festgestellt:
Photobacterium phosphoreum mit Fusarium semitectum bei pH 7,50
Photobacterium phosphoreum mit Fusarium oxysporum 7 bei pH 7,75
Photobacterium phosphoreum mit Fusarium orchis von pH 7,72 bis 7,20.
Zum Vergleich hierzu sei auf die Versuche mit Aminosäuren, Pyridin, Chinolin und Anilin hingewiesen, siehe die Seiten 37 bis 55.

Tabelle 4

Verlauf der pH-Werte und der Leuchtwerte einiger Fusarienstämme mit Photobacterium phosphoreum sowie Verlauf der pH-Werte derselben Fusarienstämme ohne Photobacterium phosphoreum.

Leuchtwerte = L, durch ++++, +++, ++, + und - gekennzeichnet.
pH-Werte Pilz allein = pH P, pH-Werte Pilz + Bakterien = pH.

Bei einem pH-Wert von 8,20 wurden die Nährlösungen mit den Pilzstämmen Fusarium oxysporum 7, Fusarium "orchis" und Fusarium semitectum beimpft. Am fünften Tag wurden erneut die pH-Werte festgestellt und diese Kulturen zusätzlich mit Photobacterium phosphoreum beimpft. Der Tag der zusätzlichen Beimpfung mit Photobacterium phosphoreum gilt in der Tabelle als 1. Tag.

	Fus. oxysporum 7			Fus. "orchis"			Fus. semitectum		
	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.
1.Tag	8,12	+	8,12	7,95	+	7,97	8,05	+	8,06
2."	7,35	+			+			+	
3."	7,05	+			+	7,95	7,43	+	8,03
4."		+	8,01	7,08	+			+	
5."		+			+	7,96	7,05	+	8,05
6."	6,75	+	8,00	6,70	+			+	
7."		+			+	7,97	6,59	+	8,04
8."		+		6,31	+			+	
9."	6,31	+	7,79		+	7,99	6,25	+	8,02
10."		+		5,93	+			+	
11."		+			+		5,90	+	7,99
12."	5,80	+	7,77	5,68	+			+	
13."		+			+	7,96		+	7,97
14."		+			+		5,50	-	
15."	6,58	+		6,28	+			-	
16."		+	7,72		+	7,93	5,67	-	7,95
17."	6,98	++		6,67	++			-	
18."		++			++		6,07	++	
19."	7,18	++	7,73	7,00	++			++	
20."		++			++		6,40	++	7,94

Tabelle 4, Blatt 2

	Fus. oxysporum 7			Fus."orchis"			Fus. semitectum		
	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.
21.Tag	7,34	+++		7,30	+++	7,95		++	
22."		+++	7,74		+++		6,62	++	7,93
23."	7,45	+++		7,49	+++			++	
24."		+++			+++			++	
25."	7,55	+++	7,75	7,68	+++	7,99	6,88	++	7,94
26."		+++			+++			++	
27."	7,64	+++			+++		6,98	++	
28."		+++	7,75	7,66	+++			++	
29."	7,73	+++			+++		7,07	+++	7,90
30."		+++		7,64	+++	8,02		+++	
31."		+++	7,75		+++			+++	
32."	7,87	++		7,62	+++	8,04	7,20	+++	
33."		++			+++			+++	
34."	7,88	++	7,82		+++		6,72	++	7,91
35."		++		7,64	+++			++	
36."	7,90	++			+++		6,24	++	
37."		++		7,65	+++	8,17		++	
38."		++	7,98		+++		5,80	++	7,90
39."	7,92	++		7,67	+++			++	
40."		++			+++			++	
41."	7,91	++		7,69	+++	8,13	5,38	-	
42."		++			+++			-	
43."	7,89	++	7,95		+++		5,14	-	7,88
44."		++		7,72	++++			-	
45."	7,87	++			++++		4,90	-	
46."		++		7,66	++++	8,07		-	
47."	7,85	+++	7,88		++++		4,99	-	7,85
48."		+++		7,60	++++			-	
49."		+++			++++		5,12	-	
50."	7,80	+++	7,89	7,52	++++	8,05		-	

Tabelle 4, Blatt 3

	Fus. oxysporum 7			Fus."orchis"			Fus. semitectum		
	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.
51.Tag		+++			++++		5,30	-	7,86
52."		+++		7,43	++++			-	
53."	7,75	++++			++++		5,67	-	
54."		++++		7,31	++++	8,04	5,87	++	
55."		+++	7,87	7,25	++++		6,07	++	
56."	7,70	+++		7,20	++++		6,27	++	7,90
57."		+++			++++			++	
58."		+++		7,27	++++	8,02	6,40	++	
59."		+++	7,86		++++			++	
60."	7,70	+++		7,33	++++		6,60	++	7,93
61."		+++		7,39	++++		6,58	++	
62."		+++			++++			++	
63."		+++	7,84	7,30	++++	7,99	6,30	++	
64."	7,60	+++			++++			++	
65."		+++		7,28	++++			++	
66."		+++			++++		5,88	++	7,94
67."	7,63	+++	7,82	7,30	++++	7,96		++	
68."		+++			++++		6,28	++	
69."		+++		7,39	++++			++	
70."	7,66	+++			+++		6,55	++	
71."		+++	7,82	7,50	+++	7,92		++	
72."		+++			+++		6,87	++	7,95
73."	7,70	+++		7,62	+++			++	
74."		+++			+++		7,09	+++	
75."		+++	7,80	7,79	+++	7,90		+++	
76."	7,75	++++			+++		7,25	+++	7,95
77."		++++		7,82	+++			+++	
78."		+++			+++		7,35	+++	
79."	7,79	+++		7,85	+++	7,93		+++	
80."		+++	7,79		+++		7,46	+++	

Tabelle 4, Blatt 4

	Fus. oxysporum 7			Fus."orchis"			Fus. semitectum		
	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.
81.Tag	7,82	+++		7,87	+++		7,50	++++	7,96
82."		+++			+++			++++	
83."	7,79	+++		7,81	+++	7,95	7,15	+++	
84."		+++			+++			+++	
85."	7,76	+++	7,79	7,55	+++		6,86	++	7,96
86."		+++			+++			++	
87."	7,73	+++		7,69	+++	7,98	6,58	++	
88."		+++			+++			++	
89."	7,72	+++	7,78	7,60	+++		6,35	++	7,97
90."		+++			+++			++	
91."	7,71	+++		7,48	++++	7,98	6,15	++	
92."		+++			++++			++	
93."	7,70	+++	7,77	7,36	++++		5,98	++	7,96
94."		+++			++++			++	
95."	7,70	+++		7,25	+++	7,96	5,83	++	
96."		+++			+++			++	
97."		+++		7,16	+++			++	
98."		+++			+++		6,20	++	7,96
99."		+++	7,77		+++			++	
100."	7,75	++++		7,02	+++	7,93	6,39	++	
101."		++++			+++			++	
1o2."		+++			++		6,61	++	7,97
103."	7,70	+++		6,80	++			++	
104."		+++	7,88		++		6,48	++	
105."		+++			++			++	
106."	7,70	+++		6,57	++		6,35	++	7,98
107."		+++			++			++	
108."		+++			++	7,90	6,21	++	7,98
109."	7,70	+++	7,87	6,32	++			++	
110."		+++			++			++	

Tabelle 4, Blatt 5

	Fus. oxysporum 7			Fus. "orchis"			Fus. semitectum		
	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.	pH	L	pH P.
111. Tag		+++			++		6,00	+	
112."	7,71	+++	7,88	6,45	++	7,96		+	
113."		+++			++			+	
114."		+++			++		5,82	+	7,97
115."	7,72	+++		6,75	++	7,98		+	
116."		+++	7,88		++			++	
117."		+++			++		6,18	++	
118."	7,73	+++		6,82	++	7,95		++	
119."		+++			++		6,41	++	7,97
120."	7,74	+++	7,89	7,01	++	7,91	6,75	++	

Auswertung:

Aus der Tabelle ergibt sich insofern ein deutlicher Zusammenhang von Leuchten und Gang des pH-Wertes, als unter etwa pH 5,6 das Leuchten schwindet, bei abermaligem pH-Anstieg wiederkehrt. Gute Lichtentwicklung finden wir bei pH-Werten etwa > 6,0, sehr gutes Leuchten ungefähr ab neutraler Reaktion (pH > 7,0).

Die Gegenwart der Pilze verhindert das starke Absinken des pH-Wertes, wie wir es in reinen Bakterien-Kulturen beobachten, die dementsprechend rasch das Leuchten einstellen.

E. Die Untersuchung der Fusarienkulturen und ihrer Nährfiltrate.

1. Die Aminosäuren von Fusarium semitectum und Fusarium oxysporum 7.

Nachfolgende Untersuchungen dienten der Bestimmung der Aminosäuren, die durch Hydrolyse der im Mycel vorhandenen Polypeptide bzw. Proteine frei werden. Weiterhin wurden mit diesen Ergebnissen die qualitativen Zusammensetzungen verschiedener Peptone, des Luciferins von Cypridina, der Aminosäuren der Fischhaut, der Brauerhefe, und des Hühnereiweißes verglichen.

Verwendet wurden zu diesen Analysen neun Monate alte Pilzmycelien, die mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen und bei konstanter Temperatur von 50° C getrocknet worden waren.

Zur Hydrolyse wurde eine bestimmte Menge gut verriebenes Mycel mit 5 ml 6n Salzsäure in Reagenzröhrchen eingeschmolzen und vierundzwanzig Stunden bei 110° C hydrolysiert. Die braune Flüssigkeit wurde durch Filtrieren und Nachwaschen vom Rückstand getrennt. Zur Entfernung der Salzsäure wurde bei 100° C am Wasserbad eineinhalb Stunden Luft durchgeleitet. Die bis zur Trockne eingedampfte Lösung wurde mit einigen Kubikzentimetern destilliertem Wasser aufgenommen und auf Chromatographierpapier 2043 b der Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL aufgetragen und zweidimensional getrennt. Als Lösungsmittel dienten hierzu das Gemisch α- Picolin-Eisessig-Wasser (75 : 2 : 23) nach PFENNIG und Phenol pH 9,0 und pH 8,3.

Die Vergleiche wurden mit Aminosäuren der Firmen HOFFMANN-LA ROCHE und MERCK durchgeführt. Zur Lokalisation der Aminosäurenflecken wurde das Ninhydrin-Sprühreagens nach LEVY und CHUNG verwendet. Es besteht aus einer Lösung von 0,1 Gramm Ninhydrin in 95 ml absolutem Alkohol und 5 ml 2,4,6 - Collidin. Dieses zeigt nach eineinhalbstündigem Trocknen bei 80° C sehr schöne und charakteristisch gefärbte Aminosäureflecken.

E r g e b n i s s e :

In beiden Mycelien wurden Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glycin, Serin, Alanin, Valin, Leucin (Isoleucin und Phenylalanin), Lysin, Tyrosin, Prolin, Arginin und Threonin gefunden. Der Nachweis von Methionin ist in beiden Mycelien fraglich. Tryptophan wurde im Mycel von Fusarium semitectum nachgewiesen. Im Mycel von Fusarium oxysporum 7 fehlt Tryptophan. Da bei der normalen Aufarbeitung Tryptophan leicht zerstört wird, beweist das Fehlen im Chromatogramm nicht sicher die Abwesenheit dieser Aminosäure im Eiweiß.

Die Aminosäurenbestimmungen aus dem Pilzkulturfiltrat stießen infolge störender Begleitstoffe auf größte Schwierigkeiten und wurden deswegen vorläufig nicht weiter verfolgt. Chromatogramme stark eingeengter Nährfiltrate und Chromatogramme von Nährfiltrathydrolysaten der verschiedensten Fusarien unterschiedlichen Alters zeigten immer wieder mit Ninhydrin gute Farbreaktion. Die entstandenen Flecken konnten jedoch nicht eindeutig getrennt werden. Es dürfte sich dabei wohl um Peptide handeln, die aus Asparaginsäure, Glycin und weiteren Aminosäuren bestehen. Auch Alkoholextrakte ergaben keine besseren Resultate.

2. Das Fluoreszenzvermögen.

Charakteristisch für die einzelnen Pilzkulturfiltrate war ihr Fluoreszenzvermögen, das ständig unter einer UV-Lampe im Vergleich mit Blindproben überprüft wurde. Mit Natriumdithionit trat Reduktion ein, jedoch nach einigen Minuten Schütteln an der Luft war das Fluoreszenzvermögen wieder hergestellt. Alle Fusariennährfiltrate fluoreszierten unter der UV-Lampe weißlich bis blaugrün. Die Reduktion mit Natriumdithionit und die Autoxydation an der Luft läßt flavinartige Stoffe vermuten.

Um die stark fluoreszierenden Farbstoffe des Fusarium semitectum- und des Fusarium oxysporum 7 Nährfiltrats zu isolieren, wurden die Eiweißbestandteile durch Methanol ausgefällt, abzentrifugiert und durch ein Bakterienfilter geschickt. Das eingeengte Filtrat wurde mit Propanol-Wasser (7 : 2) aufsteigend chromatographiert. Es ließen sich hierbei unter der UV-Lampe acht fluoreszierende Flecken der verschiedensten Farbtönungen unterscheiden, die nicht Ninhydrin positiv waren.

Bei einer Fällung mit Aceton wurden aus der abzentrifugierten Lösung chromatographisch auch acht deutlich unterscheidbare Flecken aus dem Nährlösungsfiltrat des Stammes Fusarium oxysporum 7 isoliert, beim Kulturfiltrat des Stammes Fusarium semitectum ergaben sich sogar noch mehr Flecken. Es handelt sich also bei dieser Fluoreszenz der Nährfiltrate nicht um einen einheitlichen Körper, sondern um eine ganze Reihe fluoreszierender Stoffe, deren Untersuchung weitergeführt wird.

3. Ein riboflavinähnlicher Farbstoff.

Chromatogramme von Fusarium semitectum Mycel in Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) aufsteigend gelaufen, ergaben unter der UV-Lampe eine riboflavinähnliche Fluoreszenz. Es gelang jedoch in keinem Fall diese Fluoreszenz eindeutig auf den Rf-Wert der Riboflavin-Vergleichsfluoreszenz zu lokalisieren, denn mangels scharfer Begrenzung lief sie durch das ganze Chromatogramm durch. Als Vergleichssubstanz diente Riboflavin der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE.

4. Nachweis von Thiamin (Vitamin B_1).

Thiamin stellt nicht nur für höher organisierte Lebewesen einen unentbehrlichen Faktor dar, sondern wird auch von vielen Mikroorganismen als Wuchsstoff benötigt. Auf dieser Tatsache beruht

der mikrobiologische Phycomyces- Test, der die Mycel- Wachstumszunahme mißt, die durch eine bestimmte Thiaminmenge hervorgerufen wird.

Um Thiamin in den gemeinschaftlichen Pilzbakterien-Kulturfiltraten und im Mycel sowie in den Nährlösungen, auf welchen Fusarien gewachsen waren, nachzuweisen, wurden Filtrat und Myceldaufkochungen abgestuft der Schopferlösung zugesetzt, die folgende Zusammensetzung hat:

$MgSO_4$	0,1 Gramm
$(NH_4)_2SO_4$	0,2 Gramm
KH_2PO_4	0,3 Gramm
Glukose	4,0 Gramm

in 100 Gramm Wasser gelöst.

Zu je zwanzig Gramm dieser Schopferlösung gab ich fünf Gramm des auf Thiamin zu prüfenden Nährfiltrats oder fünf Tropfen der zu untersuchenden Myceldaufkochung. Einstellung auf pH 4 bis 4,5 war nötig. Nach Sterilisation wurden die Kolben mit einer Sporensuspension des Pilzes Phycomyces blacesleeanus beimpft. Bei Zimmertemperatur verfolgte ich das Wachstum desselben in den einzelnen Versuchsreihen. Das typische Gelbwerden alternder Thiaminlösungen war immer zu beobachten. Phycomyces blakesleeanus spricht auch auf Cocarboxylase und auf eine äquimolekulare Mischung des Thiazol- und Pyrimidinteiles an.

Untersucht wurden:

Fusarium oxysporum 14	Fusarium culmorum
Fusarium oxysporum 7	Fusarium "orchis"
Fusarium lycopersicum	Fusarium "Erde"
Fusarium semitectum	Fusarium "x"

A l l e g e n a n n t e n S t ä m m e ergaben auf Grund der durch sie ermöglichten P h y c o m y c e s - M y c e l b i l d u n g ein p o s i t i v e s E r g e b n i s . Unter ihnen sind die besten Thiaminproduzenten Fusarium "orchis", Fusarium oxysporum 7 und 14. Siehe Photographie auf Seite 28.
Die Versuche wurden mit verschieden bis zu dreihundert Tage

Abb. 2. Phycomyces blakesleeanus- Mycelwachstum auf 3 ccm Fusarium oxysporum 14 Kulturfiltrat + 20 ccm Schopferlösung.

alten Fusarienkulturen durchgeführt. Interessant ist, daß Thiamin auch noch nach Beendigung des Leuchtens der Bakterien-Pilzkulturen gut nachzuweisen war.

Chromatographisch wurde der Thiaminnachweis folgendermaßen durchgeführt:
Ein Startfleck einer wäßrigen Mycelverreibung oder eingeengten Nährfiltrats wurde auf SCHLEICHER & SCHULL Chromatographiepapier Nr. 2043 b aufgetragen. Es wurde eindimensional in Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) aufsteigend chromatographiert, nachdem das Papier zwei Stunden vorher in der Atmosphäre des Lösungsmittels hing, um bessere Trennungseffekte zu erzielen.

Thiamin ergibt mit diazotierter Sulfanilsäure eine orange Färbung.
Auch ist nach Besprühen mit einprozentigem roten Blutlaugensalz (1 Teil) und zehnprozentigem Natriumhydroxyd (10 Teile) unter der UV-Lampe ein leuchtend blauer Fleck zu sehen. Als Vergleichsubstanz diente Thiamin der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE[1].

F. Beeinflussung des Leuchtens durch Zusatz verschiedener Substanzen unter Beachtung des pH-Wertes.

1. Vergleichende Tabelle der zum Leuchtprozeß in Beziehung stehenden Polypeptide mit den gefundenen Aminosäuren der Fusarien.

Nachfolgende Tabelle gibt eine vergleichende Übersicht der Zusammensetzung der Aminosäurekörper, die auf den Leuchtprozeß des Photobacterium phosphoreum fördernd wirken.

---

[1] Den Firmen HOFFMANN-LA ROCHE und E.MERCK bin ich für Überlassung wertvoller Substanzen zu großem Dank verpflichtet.

Der Aminosäurebestand der Mycelien von Fusarium semitectum und Fusarium oxysporum 7 ist vergleichsweise angegeben. Diese Aminosäuren werden infolge Autolyse auch in älteren Fusariennährfiltraten vorhanden sein, die an sich schon Peptide auf Grund von Ektotoxinbildung (GÄUMANN 1951) enthalten. Die Angaben für Brauerhefe wurden hier gebracht, da mit Saccharomyces cerevisiae ein Leuchten von fünfhundertsechsundsechzig Tagen erzielt wurde. Wie aus einem späteren Versuch zu ersehen ist, wirkt Hühnereiweiß auch fördernd. WITTE-Pepton und Casein-Pepton MERCK fördern den Leuchtprozeß sehr. Die Angaben über die Fischhaut hielt ich für erforderlich, da die Leuchtbakterien auf einem grünen Hering sich auf der Haut des Fisches entwickeln, diese also das natürliche Substrat darstellt. Die erste Spalte der Tabelle führt die Aminosäuren auf, welche durch eigene Versuche als gut fördernd festgestellt wurden.

Tabelle 5

Vergleichende Tabelle der das Leuchten sehr gut fördernden Aminosäuren mit den gefundenen Aminosäuren der Fusarien und der zum Leuchtprozeß in Beziehung stehenden Polypeptide.

Die Zahlenangaben entsprechen Gramm Aminosäure in 100 Gramm Polypeptid (entnommen aus: Biochemisches Taschenbuch von H. M. RAUEN, Springer Verlag 1956).

Leuchtprozeß sehr gut fördernde Aminosäuren	Fusarium semitectum	Fusarium oxysporum 7	Luciferin (Cypridina)	Brauerhefe
Glykokoll	Glykokoll	Glykokoll	Glykokoll	Glykokoll
	Alanin	Alanin		Alanin
Valin	Valin	Valin		Valin
Leucin	Leucin	Leucin	Leucin	Leucin
	(Iso)	(Iso)	Iso	Isoleucin
Serin	Serin	Serin		
	Threonin	Threonin	Threonin	Threonin
	Methionin?	Methionin ?		Methionin
				Cystin
	(Phenylalanin)	(Phenylalanin)	Phenylalanin	Phenylalanin
	Thyrosin	Thyrosin		Tyrosin
	Tryptophan			
Lysin	Lysin	Lysin	Lysin	Lysin
	Arginin	Arginin		Arginin
				Histidin
Asparaginsäure	Asparaginsäure	Asparaginsäure	Asparaginsäure	Asparaginsäure
Glutaminsäure	Glutaminsäure	Glutaminsäure	Glutaminsäure	Glutaminsäure
Prolin	Prolin	Prolin	Prolin	Prolin
	vielgelber	wenig gelber	gelber Farbstoff	
	Farbstoff	Farbstoff	eine unbekannte	
			Aminosäure	

Casein-Pepton MERCK	WITTE Pepton		Hühnereiweiß		Fischhaut	
Glykokoll	Glykokoll	5,7	Glykokoll	3,05	Glykokoll	29,60
Alanin	Alanin	3,7	Alanin	6,72	Alanin	9,20
Valin	Valin	3,9	Valin	7,05	Valin	2,50
Leucin	Leucin	7,1	Leucin	9,20	Leucin	3,70
	Isoleucin	4,6	Isoleucin	7,00	Isoleucin	1,70
Serin	Serin	7,0	Serin	8,15	Serin	5,90
Threonin	Threonin	6,2	Threonin	4,03	Threonin	3,50
Methionin	Methionin	2,6	Methionin	5,20	Methionin	2,30
Cystin	Cystin	1,5	Cystin	0,51	Cystin	0,20
			Cystein	1,35		
	Phenylalanin	5,0	Phenylalanin	7,66	Phenylalanin	2,40
Tyrosin	Tyrosin	5,2	Tyrosin	3,68	Tyrosin	0,86
Tryptophan	Tryptophan	3,3	Tryptophan	1,20		
Lysin	Lysin	10,1	Lysin	6,30	Lysin	5,60
Arginin	Arginin	7,7	Arginin	5,72	Arginin	9,40
Histidin	Histidin	2,5	Histidin	2,35	Histidin	0,94
	Asparaginsäure	12,6	Asparaginsäure	9,30	Asparaginsäure	7,10
Glutaminsäure	Glutaminsäure	14,8	Glutaminsäure	16,50	Glutaminsäure	11,50
Prolin	Prolin	3,9	Prolin	3,60	Prolin	13,70
	Ammoniak	1,3				

2. Der Einfluß von Eiweißstoffen, bzw. Bausteinen.

a) WITTE-Pepton.

Das schon von RICHTER verwendete WITTE-Pepton erwies sich als Zusatz zur Fischbouillon sehr günstig. Einprozentig der vollsynthetischen flüssigen Nährlösung (es ist hierbei stets in folgenden Versuchen die auf Seite 5 angegebene Nährlösung ohne Glutaminsäure gemeint) zugegeben, erzielte sehr günstige Leuchtwerte. Das Leuchten dauerte zehn Tage.

Die Leucht- und pH-Werte sind in der nachfolgenden graphischen Darstellung Seite 33 aufgeführt. (Der Leuchtwert ist mit "L" bezeichnet).

b) Casein-Pepton MERCK.

Das Leuchten auf flüssigem vollsynthetischen Nährboden mit ein Prozent Casein-Pepton MERCK war genau so lange wie mit WITTE-Pepton sichtbar. Die Leuchtwerte waren jedoch nicht so günstig wie mit einprozentigem WITTE-Pepton. Die Leucht- und pH-Werte sind auf Seite 34 aufgeführt.

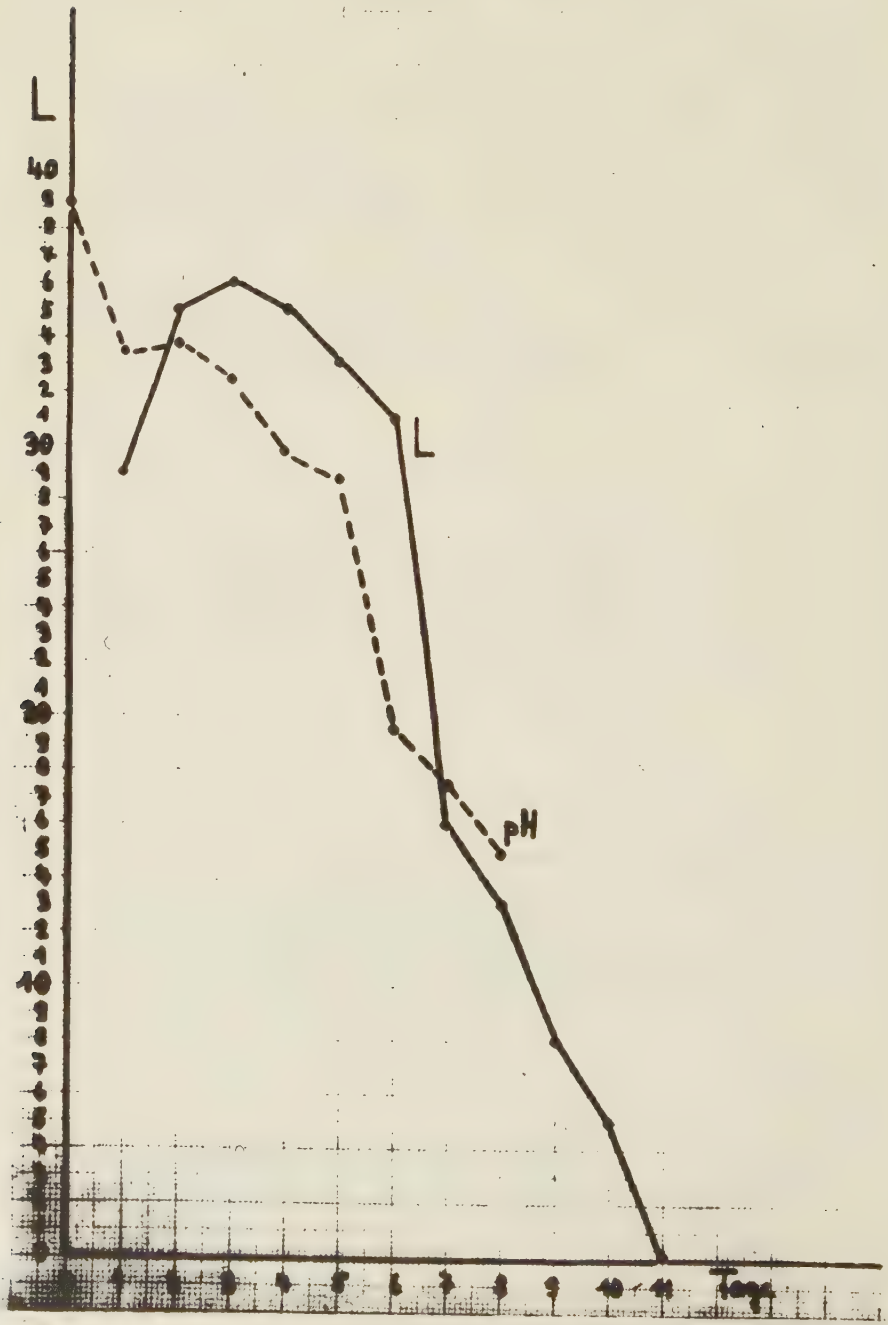
c) Fleisch-Pepton MERCK.

Bei diesen Versuchen mit einprozentigem Zusatz war der Leuchtprozeß schon am sechsten Tag beendet. Die Leuchtwerte blieben weit hinter denen der beiden zuvor erwähnten Peptone zurück. Dies dürfte durch die Zusammensetzung des Peptons bedingt sein. Die Leucht- und pH-Werte sind auf Seite 34 aufgeführt.

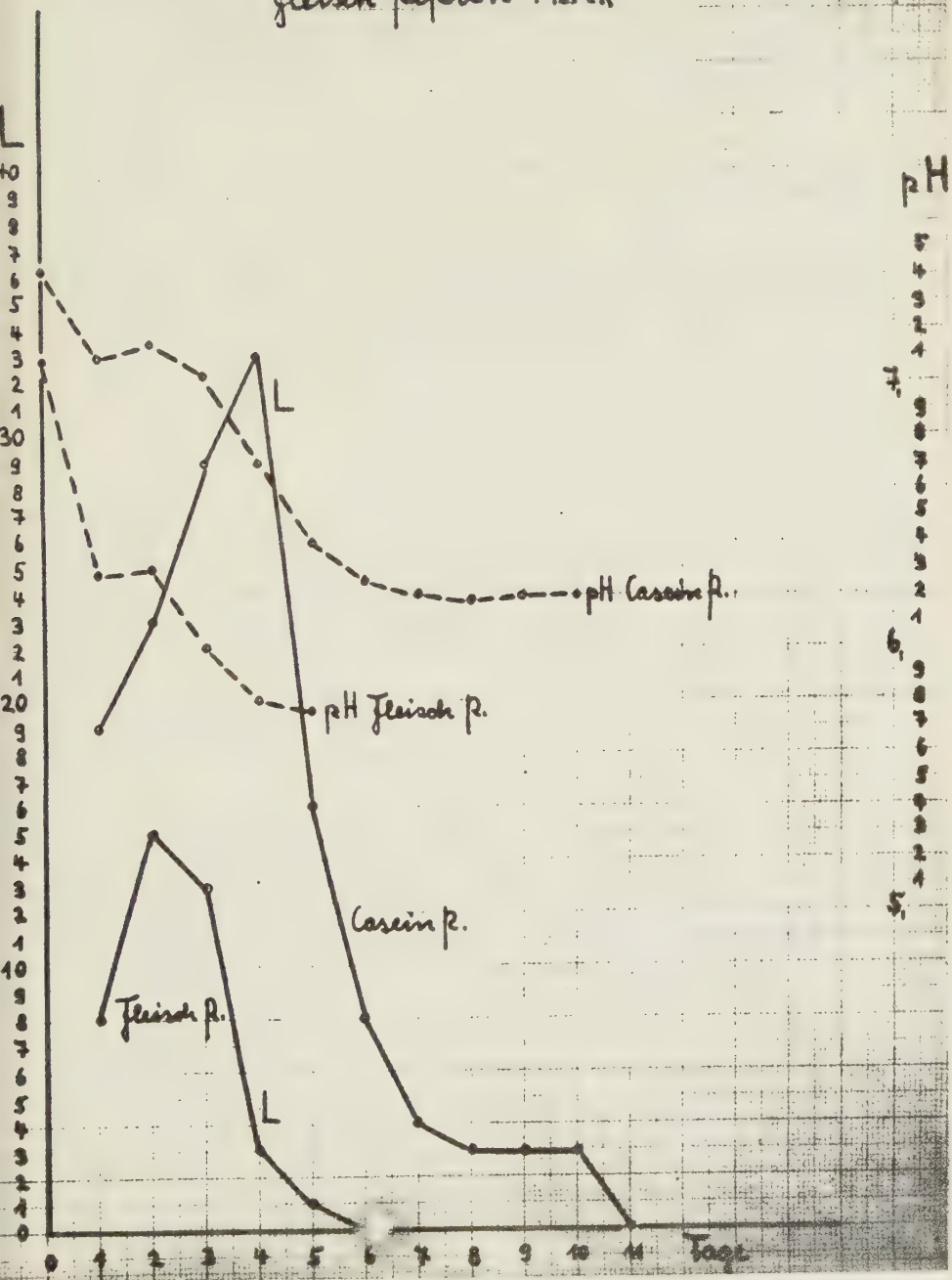
d) Hühnerei.

Zwei Versuchsreihen, eine mit synthetischem flüssigen Nährmedium einschließlich Glutaminsäure mit kleingehacktem, gekochtem

Utitle Repton



Casein Pepton Merck
Fleisch Pepton Merck



Eigelb und eine zweite gleiche Anordnung mit kleingehacktem, gekochtem Eiereiweiß, zeigten ein erheblich längeres Leuchten der Eiereiweißkulturen, wobei die unmittelbare Umgebung der Eiweißstückchen wesentlich länger und heller leuchtete als entferntere Bezirke der Kultur.

e) Protaminsulfat.

Versuche mit der Nährlösung zugesetztem Protaminsulfat zeigten kein Leuchten. Protamine enthalten keine Asparaginsäure und keine Glutaminsäure, sie bestehen hauptsächlich aus Arginin.

3. Der Einfluß von bestimmten Aminosäuren.

MUDRAK hatte schon 1933 Asparaginsäure und Glykokoll verwendet. BUKATSCH setzte 1936 seinen synthetischen Nährmedien Glutaminsäure, Leucin, Serin und Alanin mit guten Ergebnissen zu. 1954 führte SIX Versuche mit einigen Aminosäuren durch, die an gegebener Stelle erwähnt werden.
Es schien mir wesentlich, die im Mycel von Fusarium semitectum und Fusarium oxysporum 7 gefundenen Aminosäuren auf ihre den Leuchteffekt betreffende Wirkung zu untersuchen, und die dabei auftretenden pH-Werte zu verfolgen.

Der Nachweis der einzelnen Aminosäuren im gemeinschaftlichen Nährfiltrat verschiedenen Alters gelang mir infolge von Begleitstoffstörungen nicht befriedigend; man darf aber annehmen, daß infolge Autolyse die gefundenen Aminosäuren des Mycels weitgehend auch im Kulturfiltrat in gewissen Mengen vorhanden sind. Dafür dürfte auch die Ektotoxinbildung einiger Fusarien sprechen, die nach GÄUMANN neben Chinonen (einschließlich Laktonen) häufig Peptide sind, und unmittelbar nach ihrer Entstehung abgeschieden werden. Endotoxine, die auch von Fusarien gebildet

werden, sind immer Peptide. Sie werden erst nach dem Zerfall der Zellen frei. Wie auf Seite 17 angeführte Versuche erkennen lassen, besteht bereits bei zweiundzwanzig Tage alten Kulturen eine fördernde Wirkung des Nährfiltrats. Dies läßt darauf schließen, daß in der Kulturlösung den Leuchteffekt begünstigende Stoffe vorhanden sind. Aus der Tabelle Seite 23 ist eine wesentliche Förderung des Leuchtens ab achtzehnten Tag ersichtlich. Andrerseits scheinen die Farbstoffe, die Chinone sein dürften, eine Hemmung auf den Leuchtprozeß auszuüben, der sich aber erst zu einem späteren Zeitpunkt in den gemeinsamen Bakterien-Pilzkulturen bemerkbar macht. Ein sofortiges Auslöschen des Leuchtens konnte ich schon durch Zusatz von N a p h t h o c h i n o n in S p u r e n zu Photobacterium phosphoreum Kulturen (in flüssigen Kulturmedien) feststellen.

a) Valin.

Sehr günstige Leuchtwerte konnte ich mit Valin (0,05%), der α-Amino-isovaleriansäure, erzielen. Sie ist in der Brauerhefe und im Hühnereiweiß mit erheblichen Mengen vertreten. Die Leucht- und pH-Werte sind auf der Seite 37 aufgeführt.

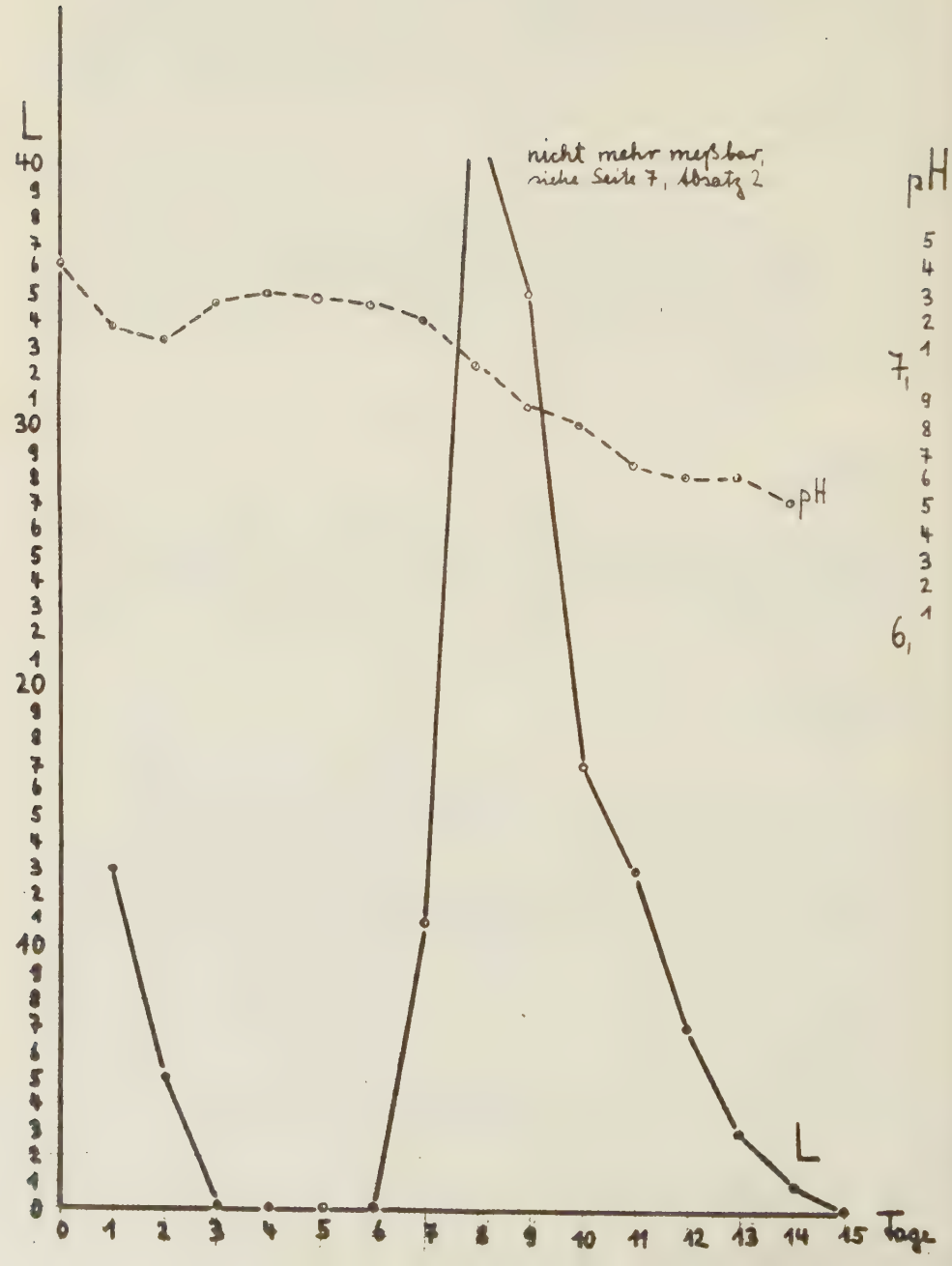
b) Arginin.

Mit Arginin (0,05%), der α-Amino-δ-guanidine-valeriansäure, konnten nur am dritten und vierten Tag gute Leuchtwerte erreicht werden; sonst war das Leuchten schwach. Arginin ist in der Brauerhefe in erheblichen Mengen, in der Fischhaut mit 9,4 und im WITTE-Pepton mit 7,7 Gramm Aminosäure in 100 Gramm Protein enthalten. Leucht- und pH-Werte siehe Seite 38.

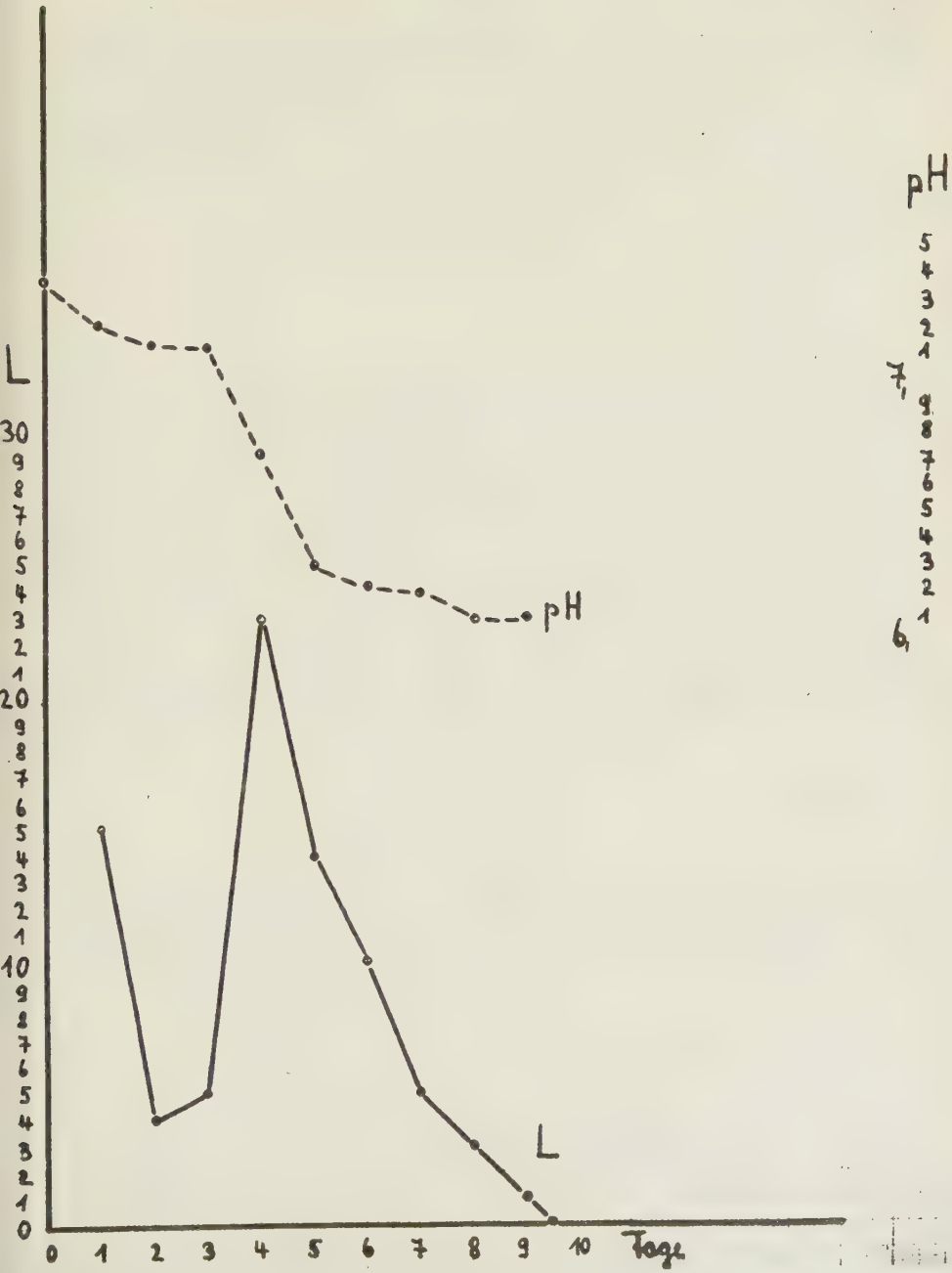
c) Lysin.

Lysin (0,05%), die α, ε-Diamino-capronsäure, zeigte annähernd so gutes Leuchten wie Asparaginsäure. Ich legte auf diese

Valin



Arginin



Versuche besonderen Wert, da Lysin außer in meinen analysierten Mycelien, vor allem auch im Luciferin der Cypridina und in allen von mir verwendeten Polypeptiden enthalten ist (siehe Tabelle 5 Seite 31). Der Lysinanteil mit 10,1 Gramm Aminosäure in 100 Gramm WITTE-Pepton ist nach Glutaminsäure und Asparaginsäure der größte. In der Hefe ist er auch sehr beträchtlich.
Die Leucht- und pH-Werte sind auf Seite 40 aufgeführt.

d) Prolin.

Prolin (0,05%), die Pyrrolidin-2-carbonsäure, zeigte erst nach acht Tagen erneutes Leuchten. (Ab zweiten Tag war der Leuchtprozeß gänzlich unterbrochen.) Die Leuchtwerte waren dann gut. Prolin ist eine Iminosäure und keine Aminosäure. Prolin und Oxyprolin sind wichtige Eiweißbausteine. Sie sind besonders reichlich, wie auch Glycin, im Collagen, der leimgebenden Substanz der Knochen und der Häute vorhanden. Die Fischhaut besitzt als zweitgrößten Aminosäureanteil nach Glycin das Prolin mit 13,7 Gramm Aminosäure in 100 Gramm Protein. Prolin ist auch im Luciferin der Cypridina sowie in den anderen im Vergleich aufgeführten Aminosäureverbindungen enthalten. Leucht- und pH-Werte siehe Seite 41.

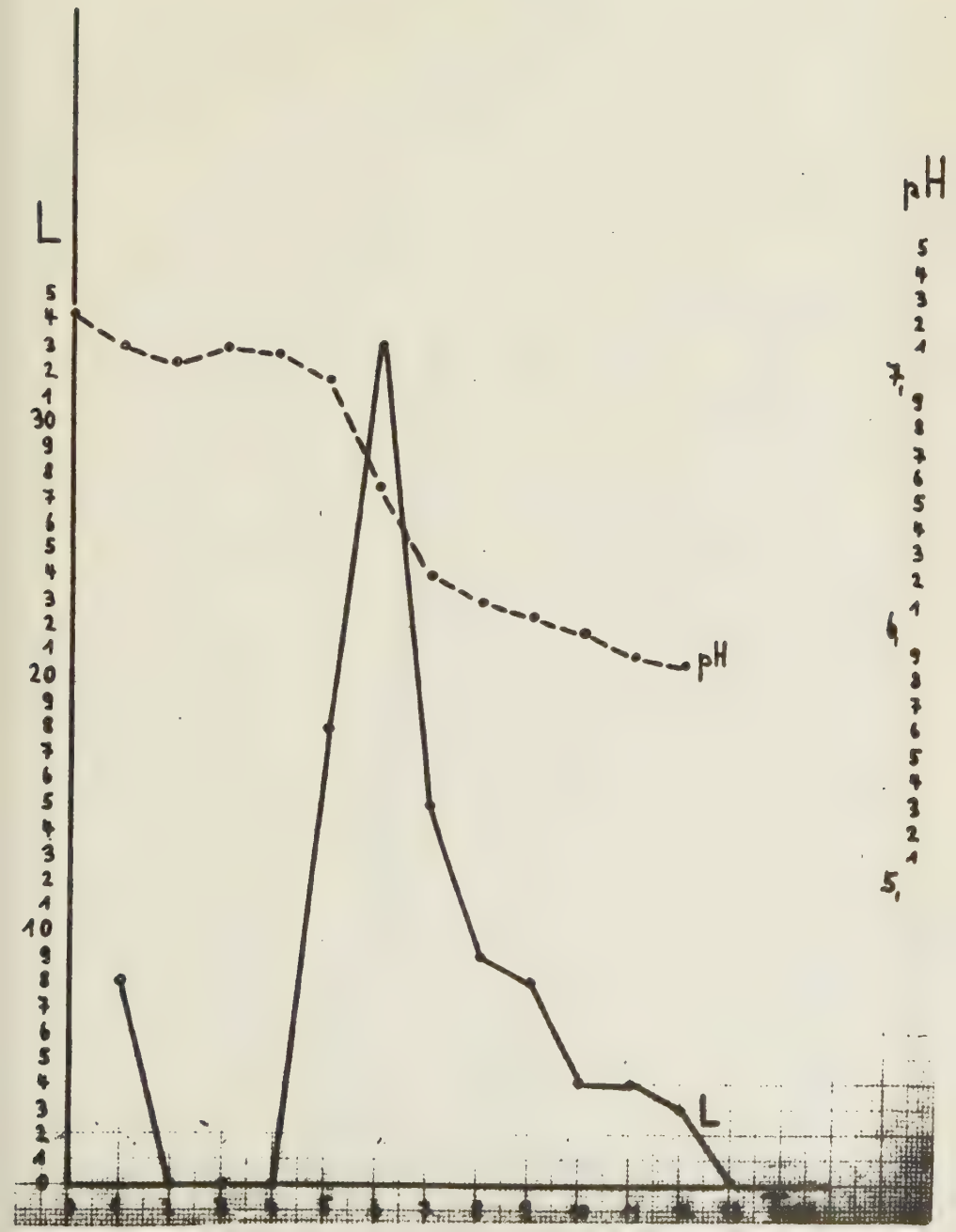
e) Glycin.

Bei Versuchen mit Glycin (0,1%), der Amino-essigsäure, konnte ich recht gute Leuchtwerte erzielen. Glycin ist in der Fischhaut mit 29,6 Gramm Aminosäure in 100 Gramm Protein enthalten.
Die Leucht- und pH-Werte sind auf Seite 42 aufgeführt.

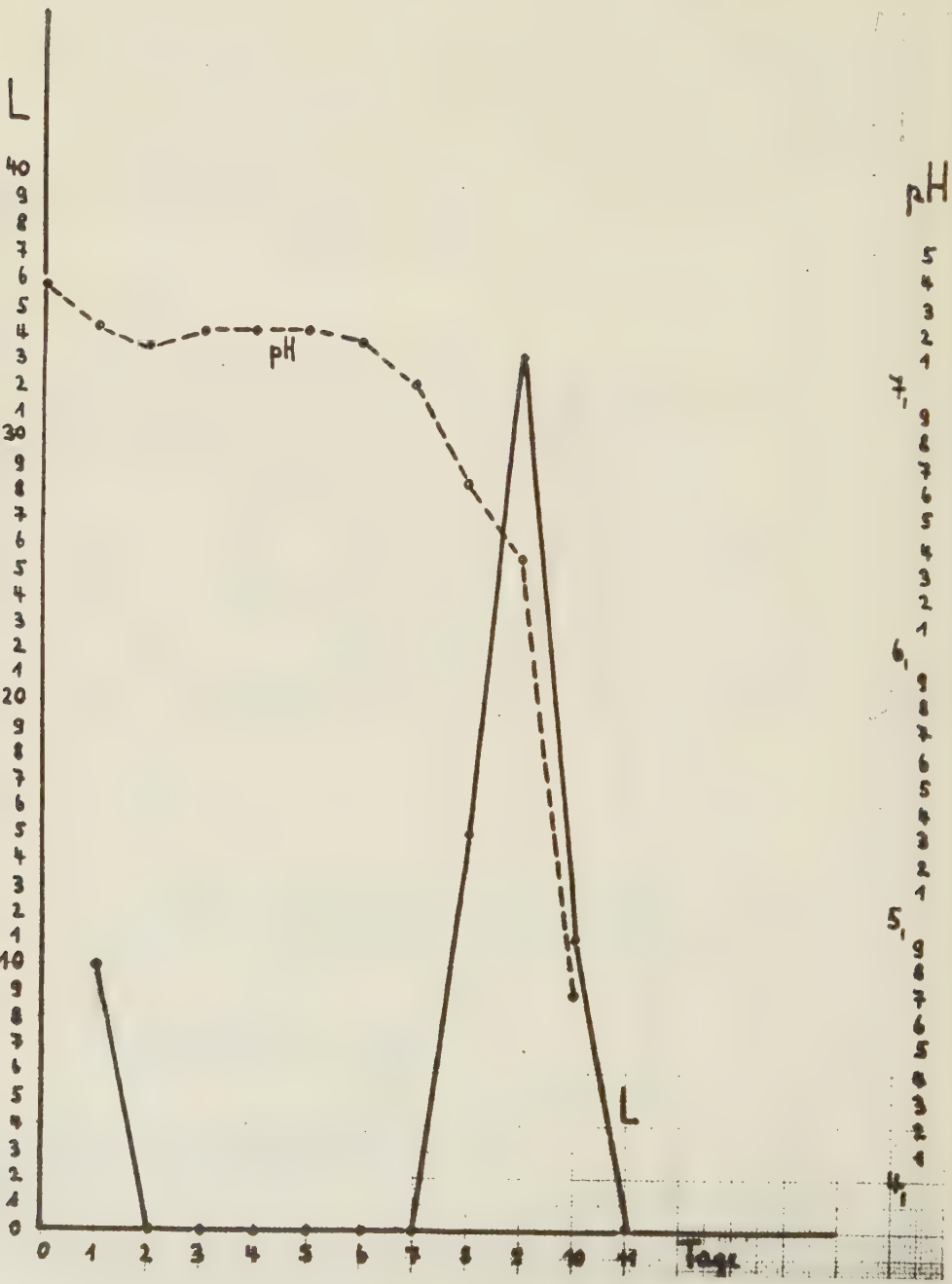
f) Threonin und Methionin.

Threonin (0,05%), die α-Amino-β-oxybuttersäure zeigte keine fördernde Wirkung auf das Leuchten.
Mit Methionin (0,05%), der α-Amino-γ-methylmercapto-butter-

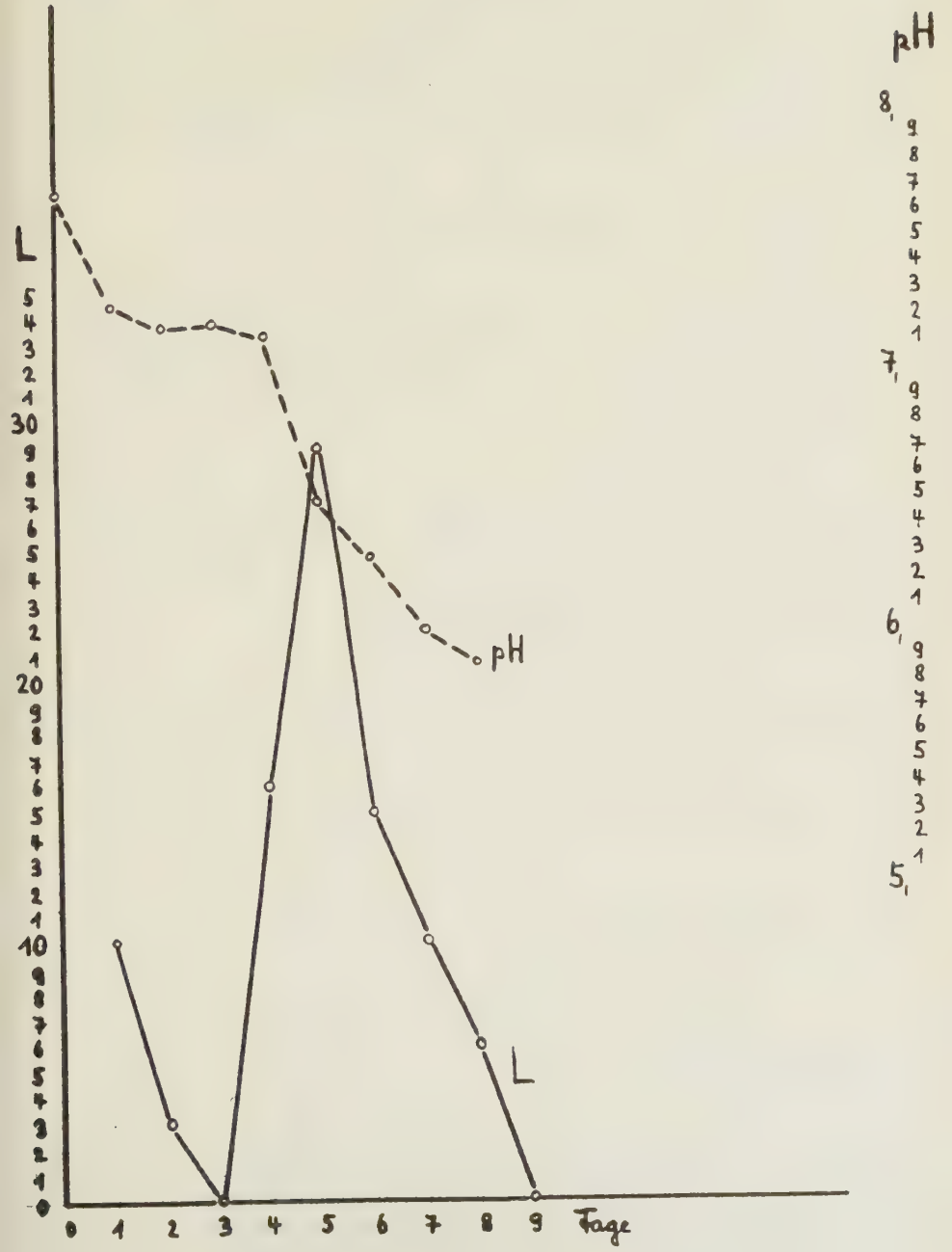
Lysin



Prolin



Glycin



säure, konnte ich auch keinen fördernden Einfluß erzielen. Threonin interessierte in seiner Wirkung, da es, wie das nachfolgend untersuchte Phenylalanin, im Luciferin der Cypridina enthalten ist. Der Threonin- und Methioninanteil der Fischhaut ist klein.

g) Phenylalanin und Tyrosin, sowie Serin.

Phenylalanin, (0,02 %), die α-Amino-β-phenyl-propionsäure, ist ebenso wie Threonin im WITTE-Pepton mit einem kleinen Anteil (2,4 Gramm Aminosäure in 100 Gramm Protein) vorhanden. Phenylalanin zeigte hemmende Wirkung. Es ist in der Hefe nur wenig vorhanden.

Eine andere Propionsäure, das Tyrosin, die α-Amino-β-(p-oxyphenyl)-propionsäure, wurde schon von LUDRAK sowie BUKATSCH als hemmend erkannt. Meine Versuche zeigten die gleichen Ergebnisse. Tyrosin ist in der Fischhaut nur minimal (0,06 Gramm Aminosäure in 100 Gramm Protein) vorhanden.

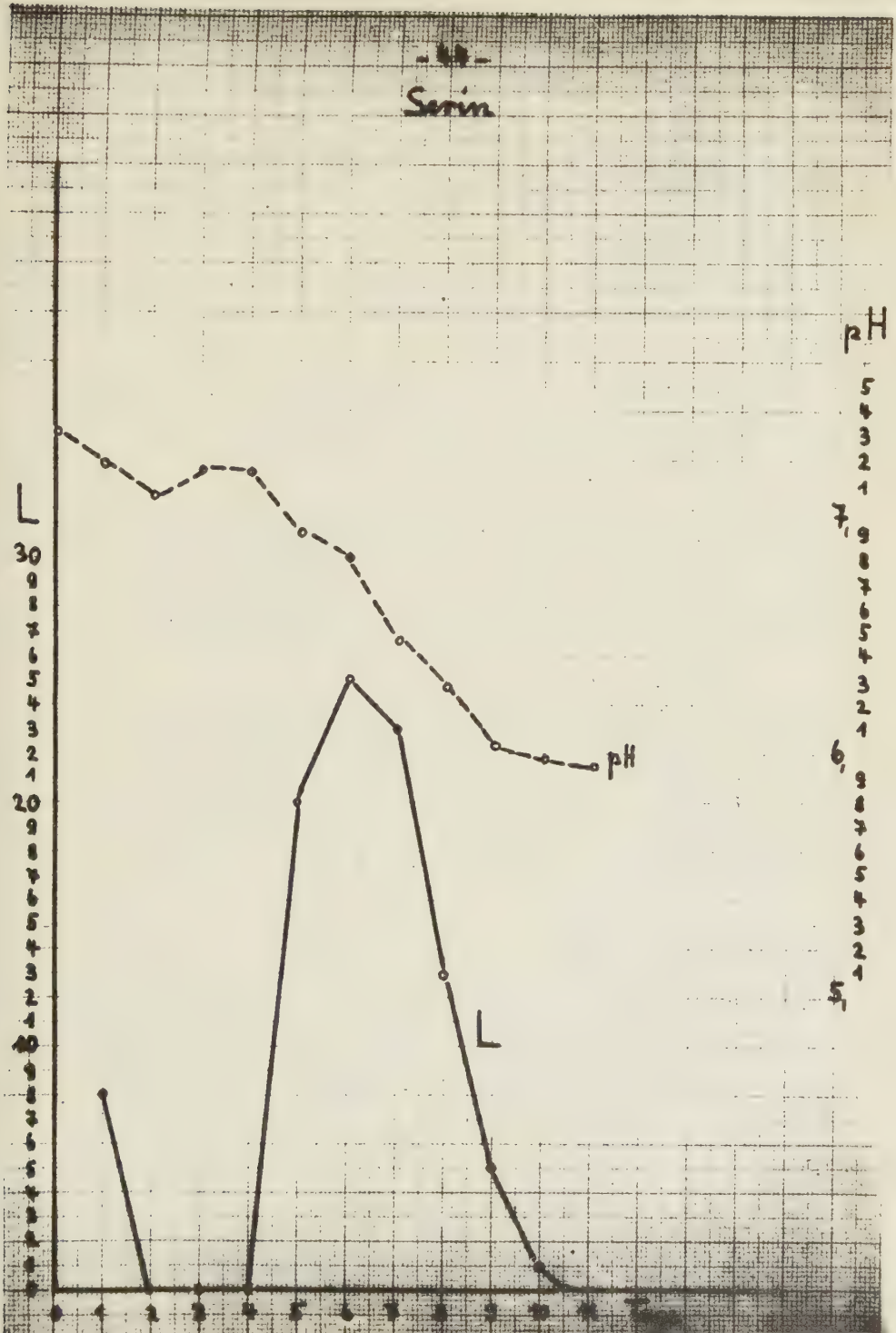
Mit Serin (0,05 %), der α-Amino-β-oxypropionsäure, konnte ich gute Lichtentwicklung erreichen. Serin findet sich nicht im Luciferin der Cypridina, aber in allen anderen in der Tabelle aufgeführten Analysen. Im Hühnereiweiß und im WITTE-Pepton ist es in beträchtlichen Mengen enthalten, während es der Brauerhefe fehlt.
Die Leucht- und pH-Werte sind auf Seite 44 aufgeführt.

Schon BUKATSCH erprobte Serin wie auch Alanin, die α-Aminopropionsäure, mit gutem Erfolg.

h) Weitere Aminosäuren, deren Wirkungen schon früher näher untersucht wurden.

Die wichtigsten Eiweißbausteine Asparaginsäure, Amino-bernsteinsäure, und Glutaminsäure, α-Amino-glutarsäure, die bei den Transaminierungsprozessen eine große Rolle spielen, zeigten

Serin



früheren Angaben (BUKATSCH 1936, SIX 1954) entsprechend, sehr gute Leuchtwerte. Asparaginsäure und Glutaminsäure sind in allen zum Vergleich in der Tabelle aufgeführten Aminosäureverbindungen reichlich vorhanden.
Die Leucht- und pH-Werte sind in der graphischen Darstellung für Asparaginsäure auf Seite 46, für Glutaminsäure auf Seite 47 aufgeführt.

Mit Leucin, der α-Amino-isobutyl-essigsäure, haben BUKATSCH sowie SIX sehr gute Werte erhalten. Leucin ist in der Fischhaut mit 3,7 Gramm Aminosäure in 100 Gramm Protein vorhanden.

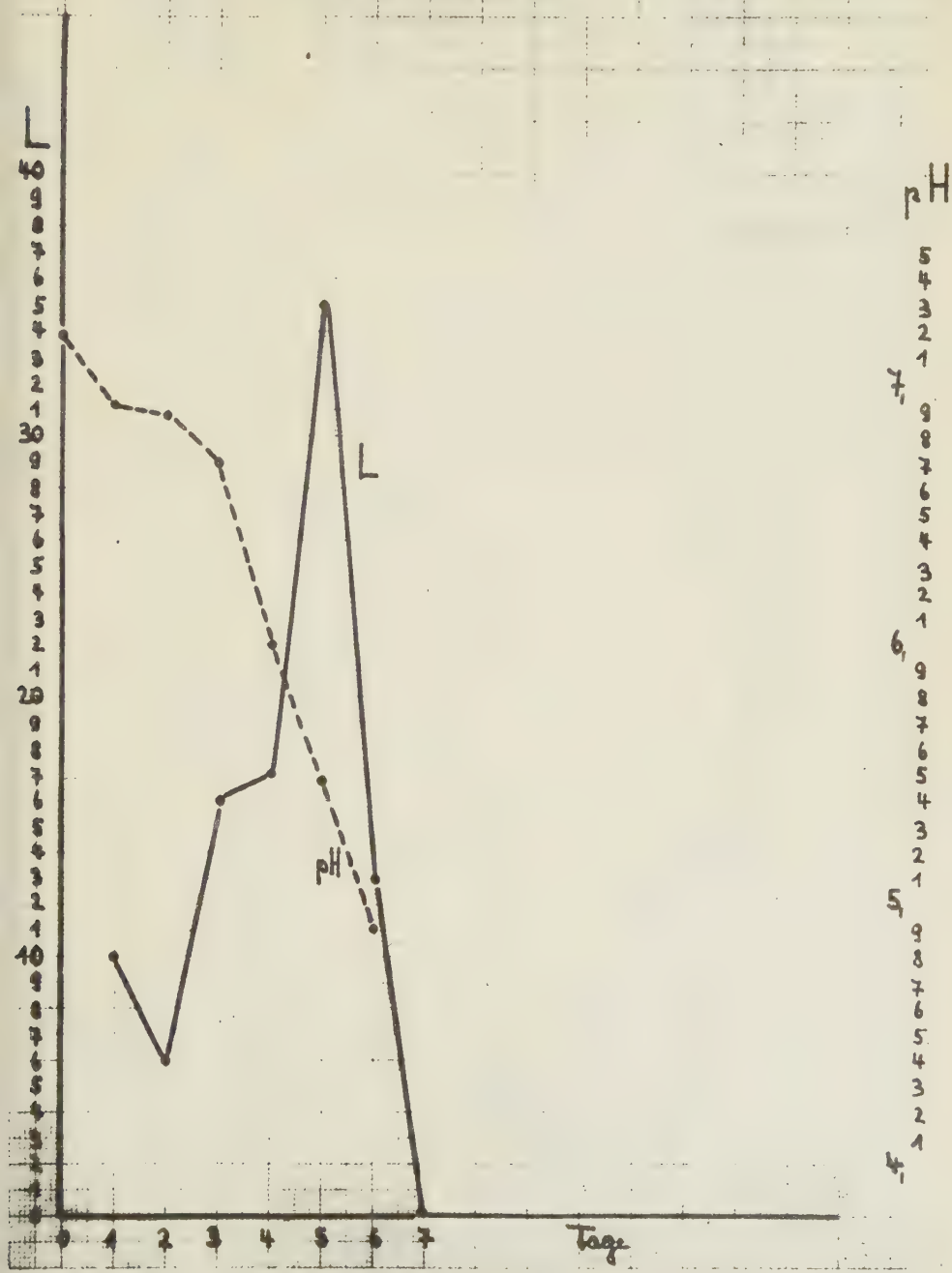
SIX führte mit Isoleucin, sec. Butyl-amino-essigsäure, Versuche durch, die mäßiges Leuchten bewirkten. Isoleucin ist mit 1,7 Gramm Aminosäure in 100 Gramm Protein der Fischhaut enthalten. Im WITTE-Pepton, der Brauerhefe und dem Hühnereiweiß sind die Anteile von Leucin und Isoleucin bedeutend größer.

Versuche mit Tryptophan, α-Amino-β-[indolyl-(3)]-propionsäure, und Cystin, Bis-(α-Amino-propionsäure)-β-disulfid, die SIX anstellte, zeigten mäßige Förderung des Leuchtens durch Cystin und gute Förderung durch Tryptophan. Cystin ist nur minimal und Tryptophan kaum in der Fischhaut enthalten, letzteres kann aber auch der Bestimmung entgangen sein.

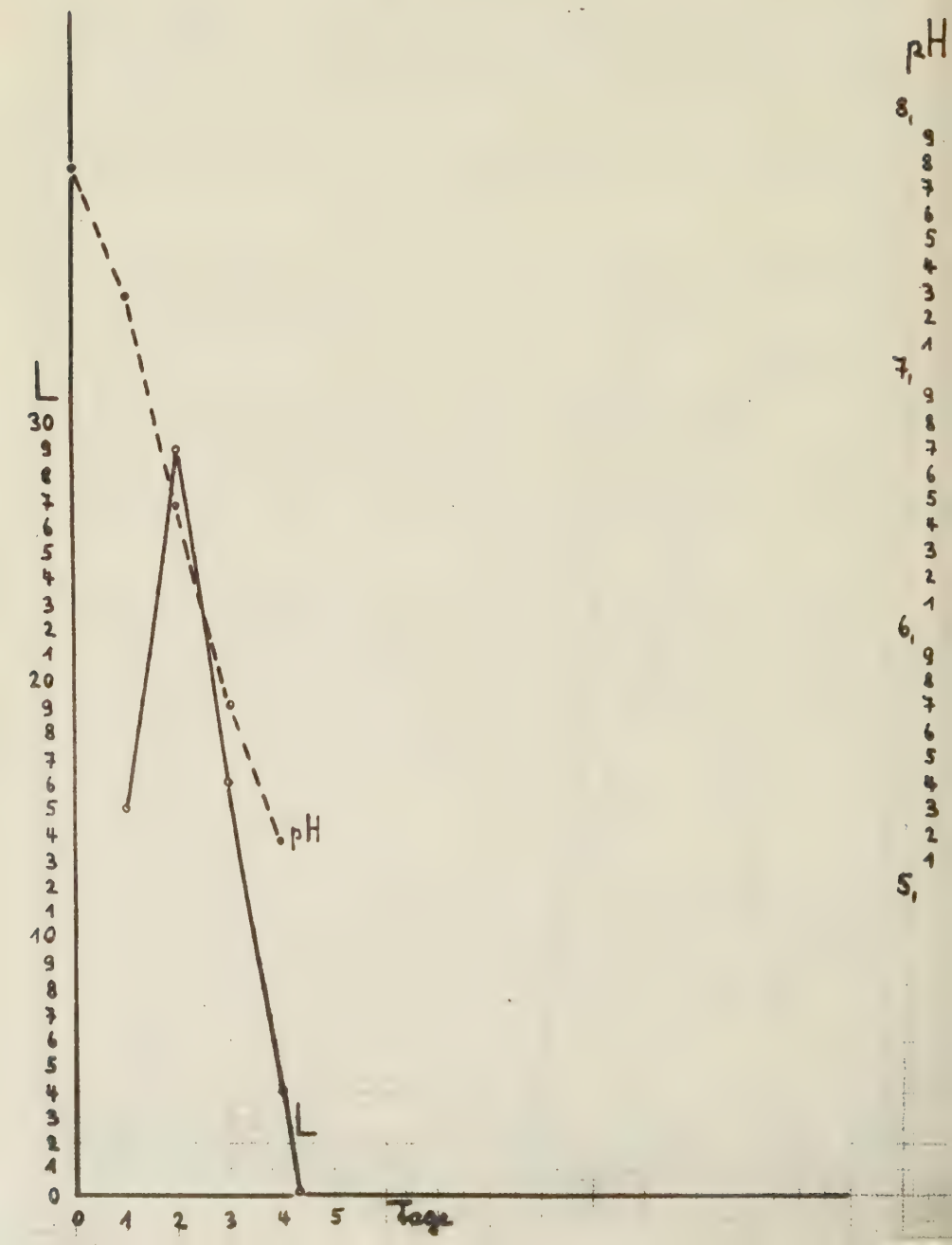
Auswertung der Versuche:

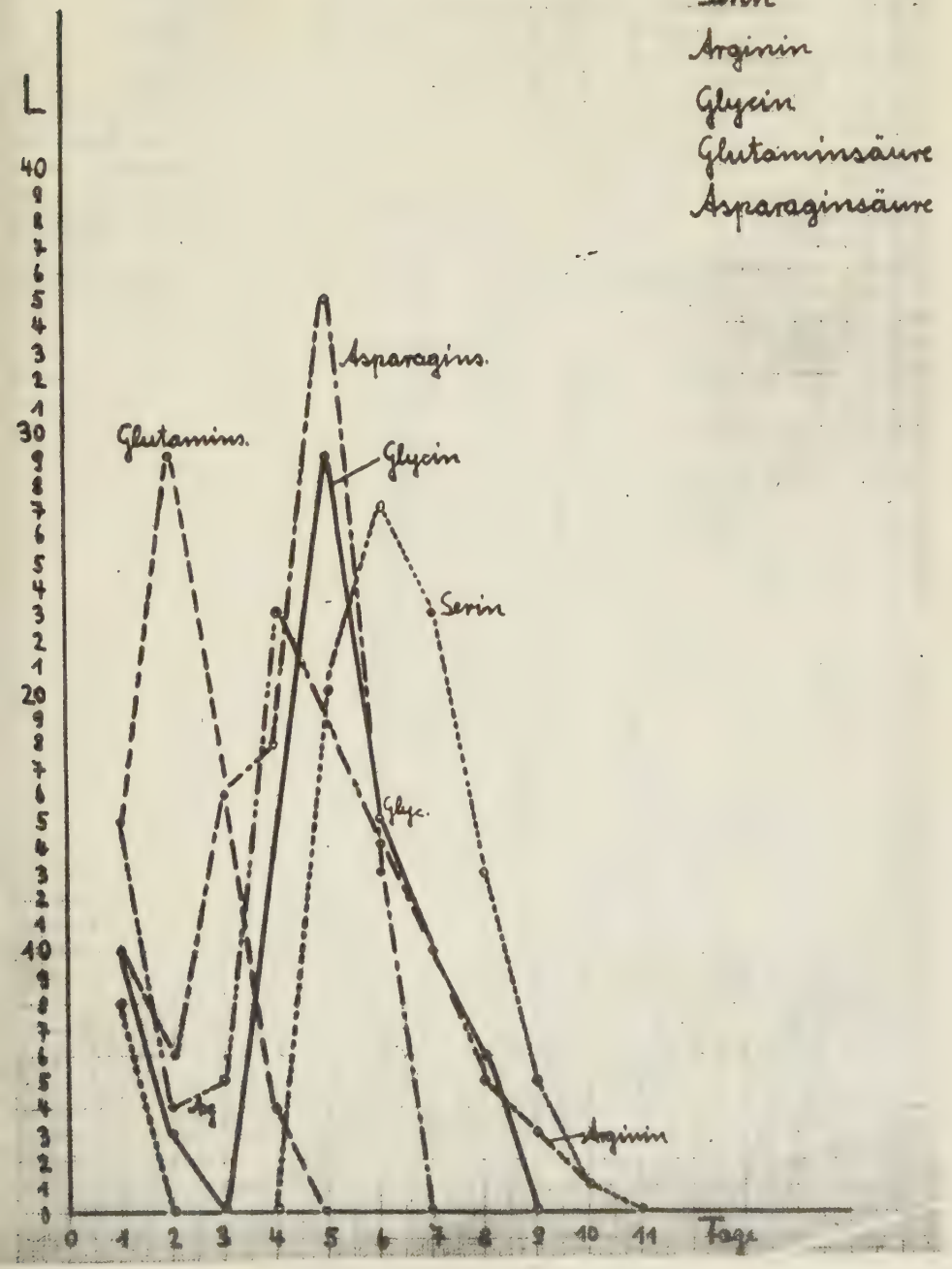
Die pH-Werte sinken verschieden rasch bei den einzelnen Aminosäure-Kulturlösungen ab; in der Regel dort, wo der Abfall mäßig oder gebremst erscheint, hielt das Leuchten länger an. Bei raschem pH-Abfall der Kulturlösung auf etwa pH 5,0 ist das Leuchten auch schnell zu Ende.

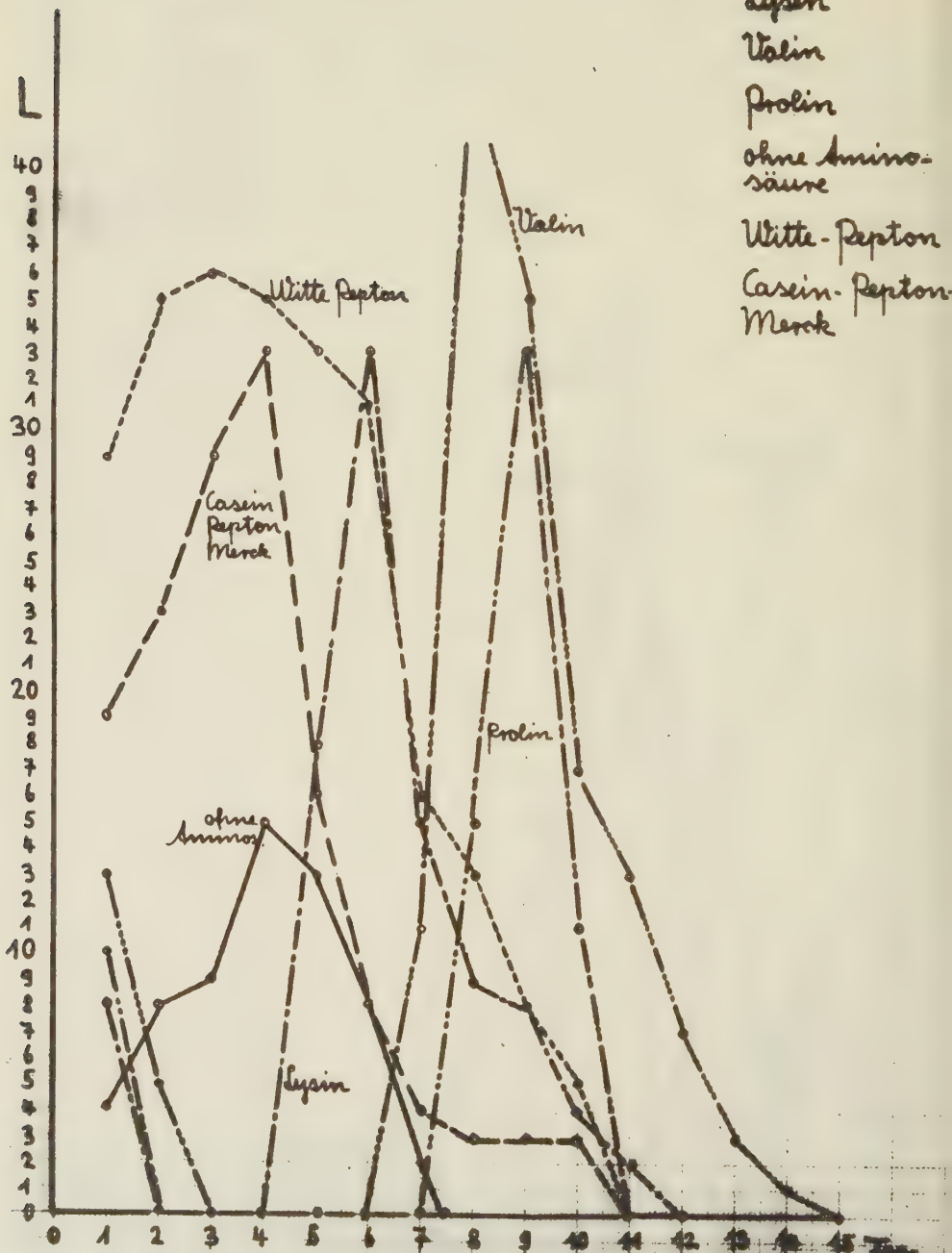
Asparaginsäure



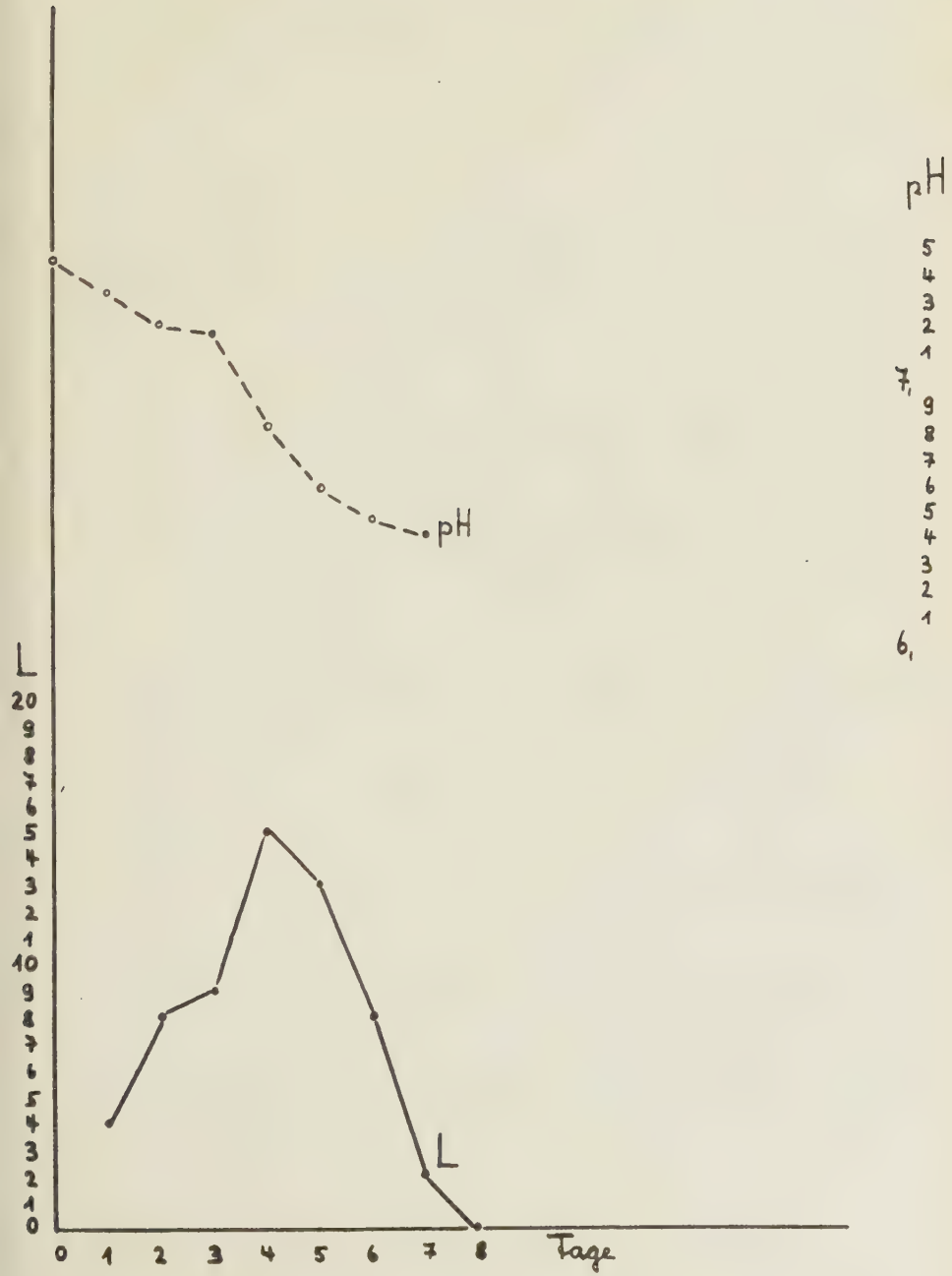
Glutaminsäure




Serin
Arginin
Glycin
Glutaminsäure
Asparaginsäure
L
Asparagins.
Glutamins.
Glycin
Serin
Glyc.
Arginin
Tage


Lysin
Valin
Prolin
ohne Aminosäure
Witte-Pepton
Casein-Pepton-Merck
L
Valin
Witte Pepton
Casein Pepton Merck
Prolin
ohne Amino
Lysin
T

ohne Aminosäure



4. Der Einfluß von Vitaminen der B-Gruppe.

Der Zellstoffwechsel erfordert die Anwesenheit von Vitaminen meistens in Form von Cofermenten.
Thiamin stellt in Form seines Pyrophosphorsäureesters das Coferment der Carboxylasen dar. Riboflavin ist in die Wirkgruppe wasserstoffübertragender Fermente, Dehydrogenasen, eingebaut. Nicotinsäureamid findet sich in den Codehydrasen I und II. Die oxydative Desaminierung der Aminosäuren und die reduktive Aminierung der α-Ketosäuren erfolgen entweder durch Flavin- oder Pyridinnucleotide. Pyridoxalphosphat ist das Coferment von Aminosäuredecarboxylasen und Transaminasen.

B-Faktoren sind an verschiedenen Reaktionen einzelner Aminosäuren beteiligt, so die Folsäure an der Synthese des Serins aus Glycin, das Pyridoxalphosphat u.a. an der Synthese und dem Abbau des Tryptophans, das Biotin wahrscheinlich indirekt an der Synthese der Asparaginsäure. Die Pantothensäure findet sich als Bestandteil des Coenzyms A (Transacetylase). Mesoinosit ist ein Wachstumsfaktor vieler Mikroorganismen.

Oft können Pilze Vitamine produzieren. Im Heringsfleisch finden sich Thiamin, Riboflavin und Nicotinsäure. Auf Grund dieser Tatsachen und des erfolgten Thiaminnachweises in den Kulturlösungen von Fusarien und in den gemeinschaftlichen Pilz-Bakteriennährlösungen sowie des möglichen Riboflavinbildungsvermögens der Fusarien (PELTIER und BORCHERS 1947) wurden Versuche mit den Vitaminen der B-Gruppe durchgeführt, deren Ergebnisse nachfolgend aufgeführt sind.

Es ist aber nicht verwunderlich, daß durch Zugabe von Vitaminen allein kein wesentlicher Einfluß auf den Reaktionsverlauf zu ersehen war, denn wenn das zugesetzte Vitamin Bestandteil eines Enzyms ist, kann es ohne Apoferment noch keinerlei Fermentwirkung durchführen. Das Vorhandensein einer Lücke im Enzymsystem einer unversehrten unter normalen Bedingungen

gewachsenen Zelle ist außerdem unwahrscheinlich. Die Versuchsergebnisse zeigten bei weitem nicht die guten Leuchtwerte wie sie die Versuche mit einigen Aminosäuren ergaben. Eine hemmende Wirkung andrerseits wurde bei keinem Vitamin der B-Gruppe festgestellt.

Thiamin.

Versuche mit Thiamin (0,5 mg % bis 0,0001 mg %) der synthetischen Nährlösung zugesetzt, ergaben etwas günstigere Leuchtwerte als die Vergleichsreihen ohne Thiamin. Sobald Thiamin mitsterilisiert wurde, nahm die Leuchtstärke zu. Dies dürfte wohl eine Wirkung von Spaltprodukten sein, die vielleicht besser in die Zelle einzudringen vermögen. In neutraler oder alkalischer Lösung wird Vitamin B_1 zerstört. Als Zersetzungsprodukte konnten Ameisensäure, γ-Thiol-γ-acetyl-propanol, 2-Methyl-4-amino-5-oxymethylpyrimidin, 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidin und 4-Methyl-5-β-oxyäthylthiazol isoliert werden. Außer vom pH-Wert hängt die Stabilität des Thiamin aber auch von der Zeitdauer des Erhitzens und von der Anwesenheit anderer Elektrolyte ab, Ferrosalze zerstören. (VOGEL und KNOBLOCH).
Synthetische Nährlösungen mit Glutaminsäure (0,05 %) und Thiamin zeigten denselben Leuchtverlauf wie Versuchsreihen gleicher Anordnung ohne Thiamin.

Riboflavin.

Versuche mit Riboflavin (5mg % bis 0,1 mg %) der synthetischen Nährlösung zugesetzt, ergaben auch etwas günstigere Leuchtwerte als die Vergleichsreihen ohne Riboflavin. Jedoch lagen die Leuchtwerte unter denen, die mit Thiaminzusatz erreicht wurden. Eine fördernde Wirkung war bei Riboflavinzusatz zur synthetischen Nährlösung mit Glutaminsäure nicht feststellbar. Die nur schwache Förderung könnte auch auf bedeutender Molekelgröße, die die Permeabilitätsschranke der Zelle nicht überwinden kann, beruhen. Ein Versuch, bei welchem Riboflavin mitsterilisiert wurde, ergab

günstigere Leuchtwerte.

Nikotinsäure und Nikotinsäureamid.

Nikotinsäure (0,005 %) und Nikotinsäureamid (0,005 %) zeigten kaum bessere Leuchteffekte als die Vergleichsreihen ohne diese Substanzen.

Adermin.

Adermin (0,01 mg % bis 0,001 mg %) zeigte nur unwesentlich günstigere Leuchtwerte. Dem Nährmedium mit Glutaminsäure zugesetzt, war kein Unterschied zu den Versuchen ohne Adermin zu erkennen.

Folsäure.

Folsäure in verschiedenen Konzentrationen (0,1 mg % bis 0,01 mg %) zugesetzt, ergab keine Förderung des Leuchteffektes.

Panthothensäure.

Calciumpantothenat (0,01 mg % bis 0,001mg %) der synthetischen Nährlösung zugesetzt, zeigte einen ganz ähnlichen Leuchtverlauf wie die Versuchsreihen ohne diese Substanz.

Inosit und Mesoinosit.

Inosit (0,02 %) der synthetischen Nährlösung zugesetzt, zeigte Förderung des Leuchtens, ebenso Mesoinosit (0,02 %). Die Leuchtwerte mit Mesoinosit lagen etwas tiefer als bei Inosit.

Biotin.

Versuche mit Biotin (0,02 %) zeigten verhältnismäßig günstige Werte.

5. Der Einfluß von Thiaminaseaktivatoren.

Abschließend möchte ich noch auf die Stoffe eingehen, die mir bei der Suche nach geeigneten Nährböden durch ihren guten Leuchteffekt auffielen. Es sind dies Pyridin, Chinolin und Anilin, die auch als Thiaminaseaktivatoren wirken können, und Chinasäure.

Weitere Versuche über Thiaminasewirkung wurden von mir nicht durchgeführt. Die Voraussetzungen einer solchen Wirkung wären allerdings durch das Vorhandensein einer Pyridincarbonsäure, der Fusarinsäure, und des Thiamins in den gemeinschaftlichen Photobacterium phosphoreum-Fusarien-Nährfiltraten gegeben. Mit den heterozyklischen Verbindungen Pyridin und Chinolin entstehen bei der Austauschreaktion als Reaktionsprodukte der Thiaminasewirkung Heterothiamin beziehungsweise Chinothiamin.

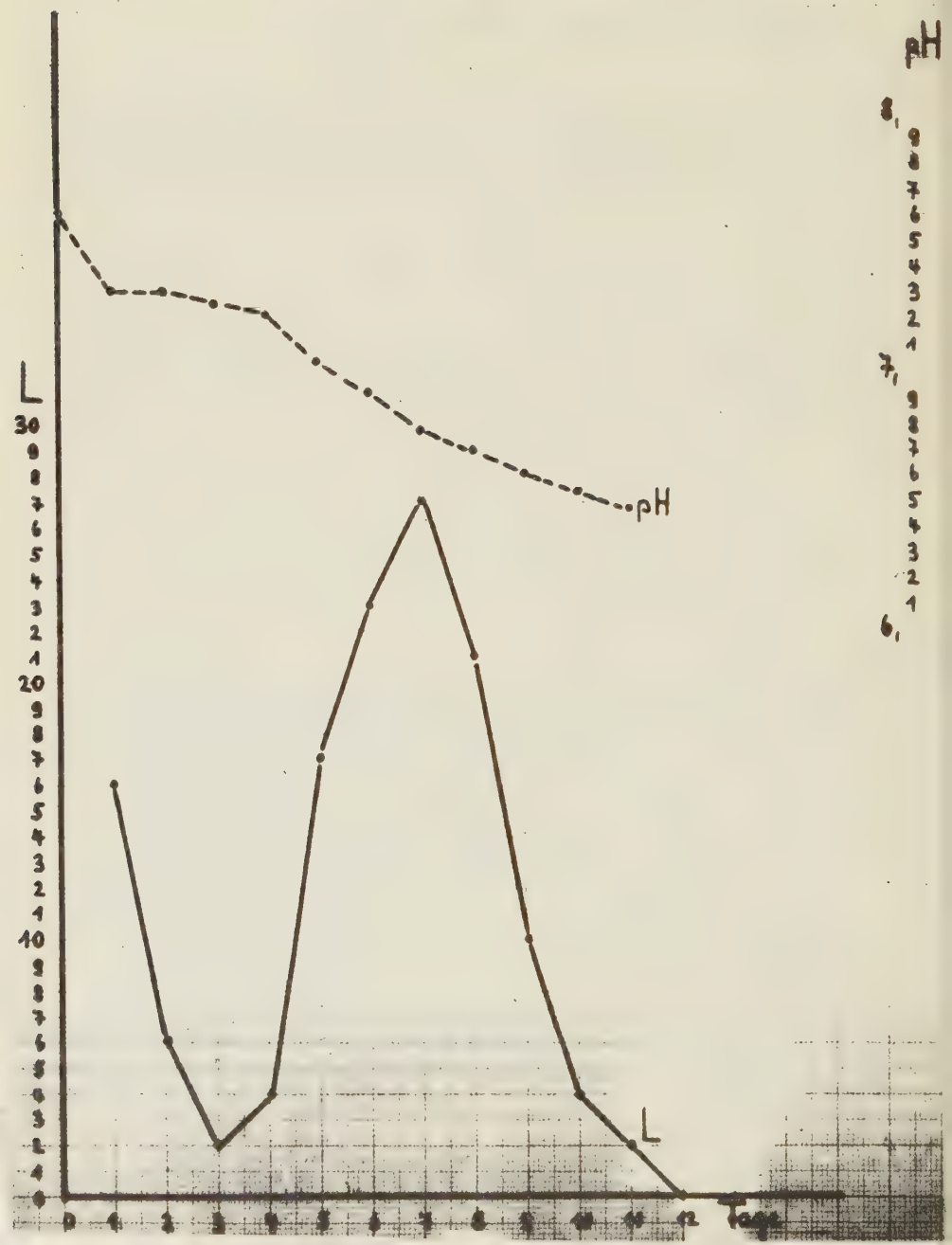
Neben anderen hemmen Cystin, Methionin und Eisen(drei)-ionen diese Reaktion. Nach VOGEL und KNOBLOCH, Chemie und Technik der Vitamine, III. Auflage I. Teil 1955, ist Chinolin stärkster Aktivator für das Enzym Thiaminase aus Bakterien (dann Pyridin und Anilin), für das Ferment aus Fisch ist stärkster Aktivator Pyridin (dann Chinolin und Anilin).

In meinen Versuchen wurden diese Stoffe der üblichen synthetischen Nährlösung zugesetzt und mit Bakterien beimpft. Ich kann daher bis jetzt nur von einer Förderung des Leuchteffektes durch diese Stoffe berichten. Es wäre auch daran zu denken, daß die Thiaminaseaktivatoren das Vitamin B_1 in kleinere, für Bakterien leichter zugängliche Spaltprodukte zerlegen.

a) Pyridin.

Versuche, die mit Pyridin (0,06 %) angestellt wurden, zeigten recht gute Leuchtwerte. Die Leucht- und pH-Werte sind auf Seite 54 aufgeführt. Vor allem wird auch das Absinken des pH-Wertes gebremst.

Pyridin



b) Chinolin, Benzo-[b]-pyridin.

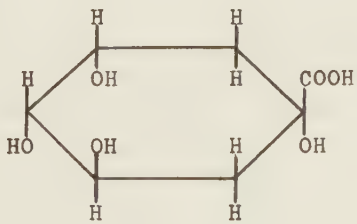
Versuche mit Chinolin (7,5 mg %) ergaben recht gutes Leuchten. Die Leucht- und pH-Werte sind auf Seite 56 aufgeführt. Eine gewisse Ähnlichkeit zum Pyridin ist erkennbar; pH- und Leuchtabfall erfolgen etwas rascher.

c) Anilin, Aminobenzol.

Versuche, die mit Anilin (7,5 mg %) durchgeführt wurden, zeigten sehr gute Leuchtwerte. Die Leucht- und pH-Werte sind in der graphischen Darstellung auf Seite 57 aufgeführt; hier ist die Ähnlichkeit zur Pyridinwirkung noch deutlicher als bei Chinolin, obgleich die chemische Struktur stärker abweicht. Andrerseits sind die Moleküle von Pyridin und Anilin ziemlich gleich groß (bezüglich Permeabilität also etwa gleichwertig).

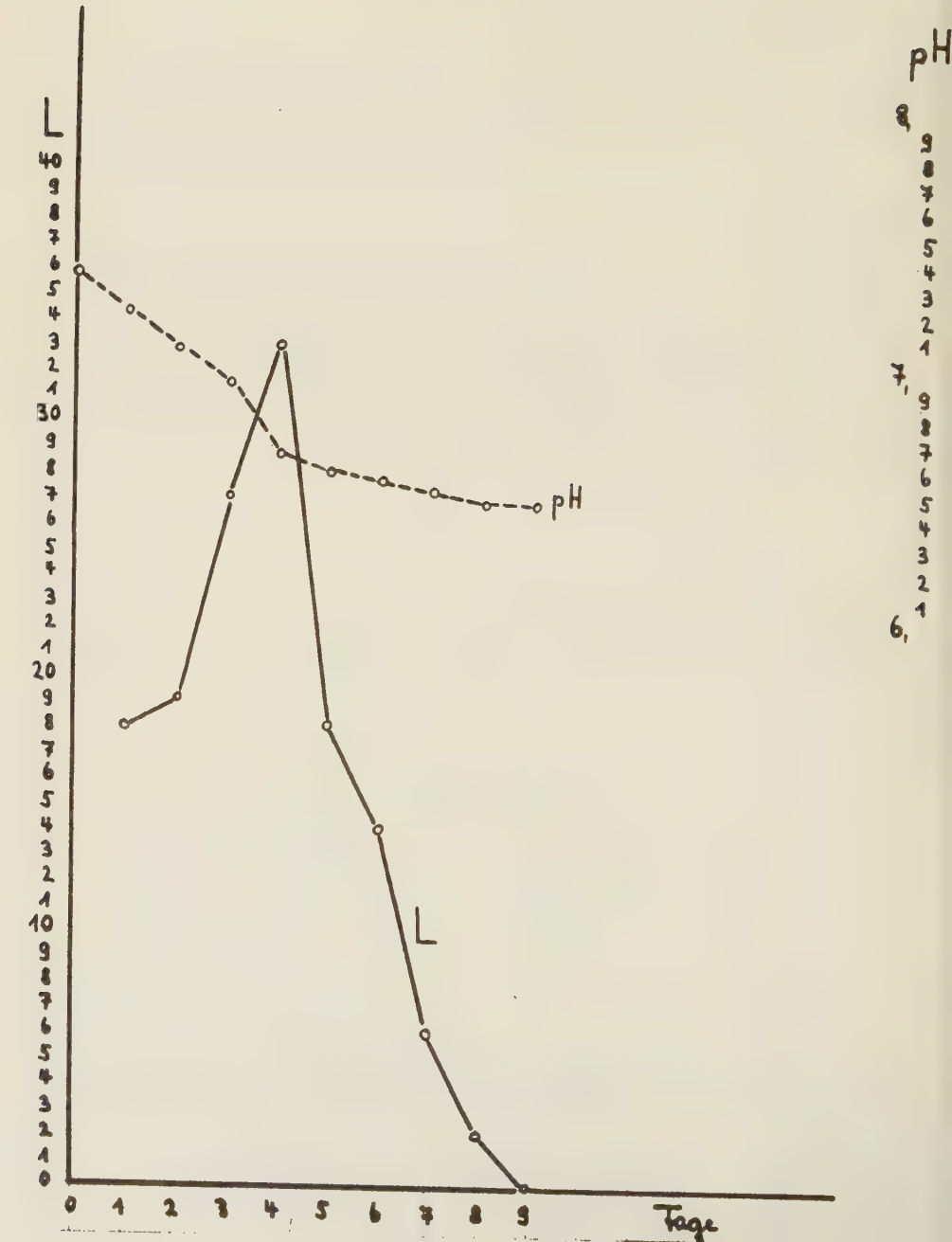
6. Der Einfluß der Chinasäure.

Chinasäure (1 % und 2 %), 1,3,4,5-Tetraoxy-cyclohexyl-1-carbonsäure,

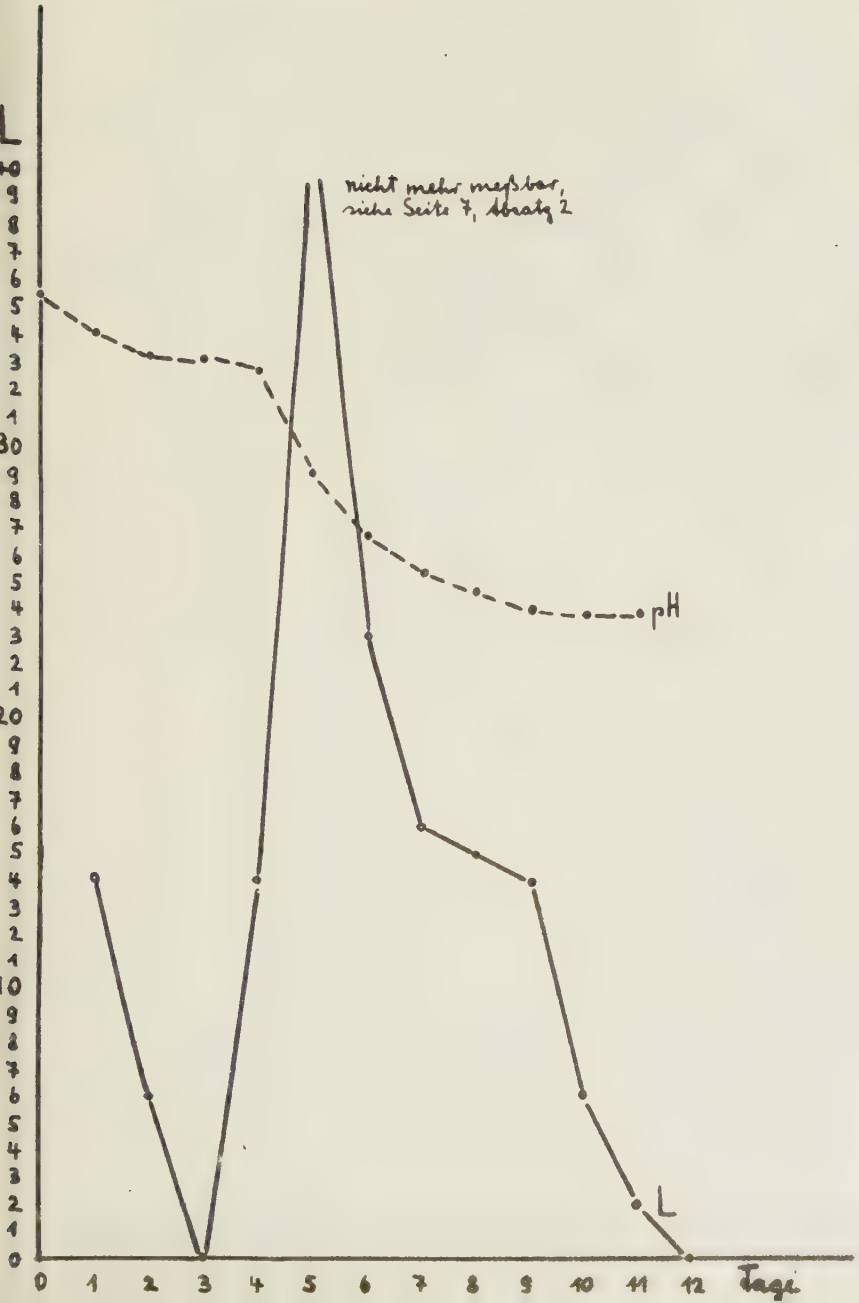


zeigte, der synthetischen Nährlösung mit Glutaminsäure zugesetzt, recht gutes und sehr langes Leuchten. Mit einem anderen

Chinolin

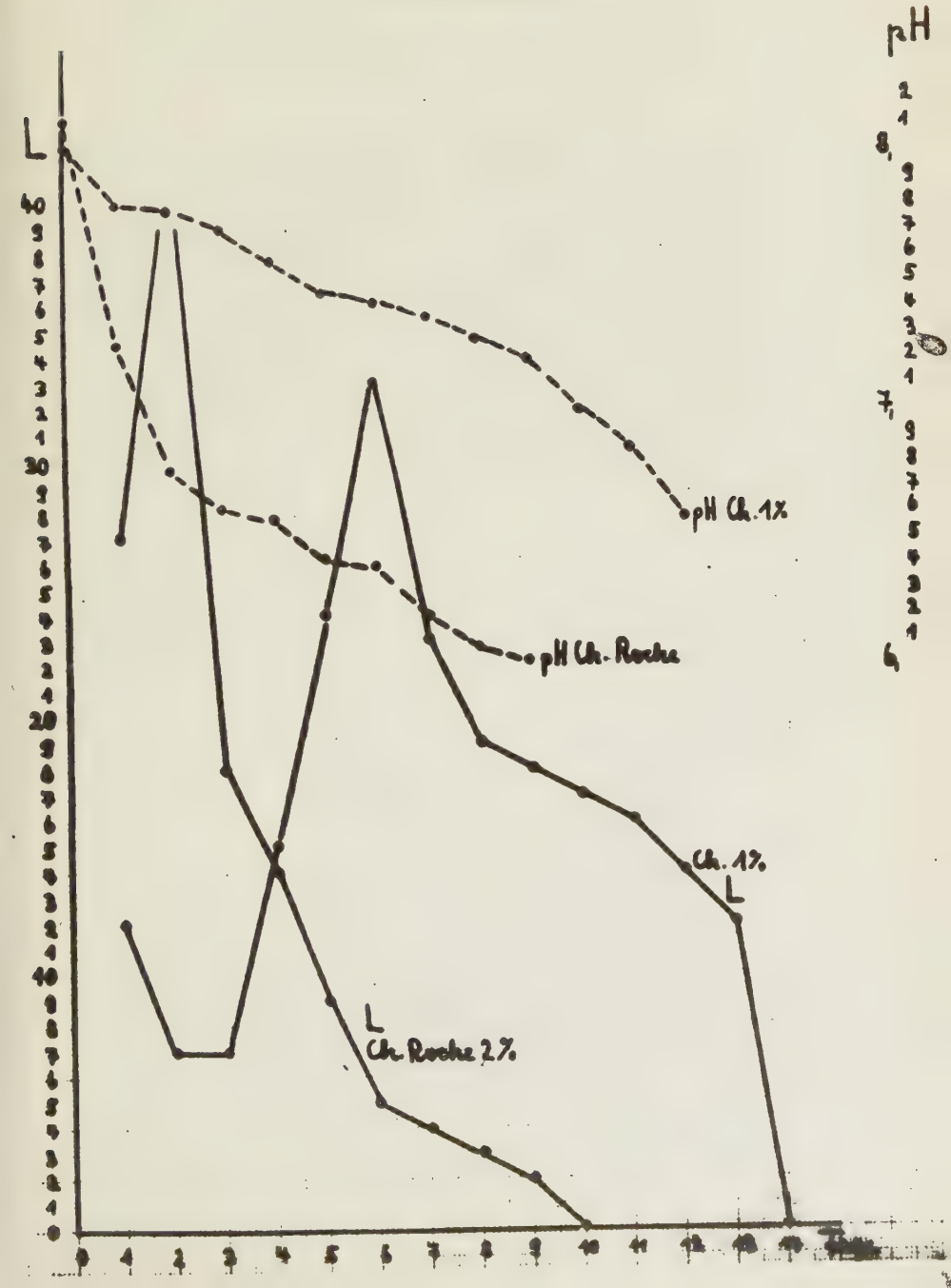


Anilin


L
nicht mehr meßbar,
siehe Seite 7, Absatz 2
pH
L
Tage
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
pH
7,
6,

Präparat einer anscheinend recht alten, wohl nicht synthetischen Chinasäure, die nicht ganz weiß war, wurde noch längeres Leuchten erzielt. Chinasäure fördert anscheinend den oxydativen Stoffwechsel, wobei Benzolderivate entstehen dürften. Nach EDELBACHER-LEUTHARDT, Lehrbuch der Physiologischen Chemie, 13. Auflage Seite 396:"In Bakterien dürfte durch Zyklisierung der Glukose Chinasäure entstehen. Diese wieder scheint für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren von großer Bedeutung bei Bakterien zu sein, denn die Chinasäure kann im Stoffwechsel zu Benzoesäure werden (BEER und Mitarbeiter)."
Die Leucht- und pH-Werte beider Chinasäurepräparate sind in den graphischen Darstellungen Seite 59 aufgeführt.

Chinasäure



Diskussion der Ergebnisse.

Unter vierzig von mir untersuchten Pilzen konnte in bestimmten Fällen bei gemeinschaftlichem Zusammenleben mit Photobacterium phosphoreum in einem flüssigem Nährmedium ein besonders gutes und außergewöhnlich langes Leuchten beobachtet werden; dies war bei verschiedenen Fusarien und Saccharomyces cerevisiae der Fall. Fusarium semitectum, Fusarium "orchis", Fusarium oxysporum 7 und 14 bewirkten eine Verlängerung des Leuchtens von durchschnittlich sechshundertfünfzig Tagen. Die Versuche zeigten deutlich, daß dem Photobacterium phosphoreum durch das Zusammenleben mit den genannten Fusarien und Saccharomyces cerevisiae Voraussetzungen geschaffen werden, die den Leuchtprozeß fördern.

Das Photobacterium phosphoreum scheint die Abscheidungen und Autolyseprodukte der Fusarienzellen zu nutzen. Denn wäre ein Leben und Leuchten so lange Zeit möglich bei dem geringen Angebot von Nährstoffen des Nährmediums? Ich habe Kulturen beobachtet, die mit

$Ca(NO_3)_2$	0,01	Gramm
$MgSO_4$	0,01	Gramm
K_2HPO_4	0,01	Gramm
$FeSO_4$	eine	Spur
NaCl	1,50	Gramm
Glyzerin	0,25	Gramm
Glutaminsäure	0,025	Gramm

über fünfhundertfünfzig Tage leuchteten. Die Leuchtdauer ohne Pilz hält in dieser synthetischen Nährlösung höchstens sieben Tage an, meistens ist sie kürzer oft nur vier Tage. Das Aminosäurenangebot infolge Autolyse dürfte reichhaltig und genügend sein, um das Leben und Leuchten des Photobacterium phosphoreum so lange Zeit zu ermöglichen.
Es wäre allerdings noch zu prüfen, ob:

a) die Pilze zunächst die Aminosäuren teilweise aufnehmen und dann langsam wieder an die Bakterien abgeben, oder
b) die Pilze zur atmosphärischen Stickstoffbindung befähigt sind.

Die Stickstoffbindung wurde in einigen zweijährigen Bakterien-Pilzgemeinschaftskulturen bestimmt. Durchweg ergaben die Untersuchungen eine Zunahme des Gesamtstickstoffgehaltes, die uns aber nicht bedeutend genug erscheint, um die so außerordentliche Verlängerung des Leuchtens zu erklären.

Eine ganze Reihe von Aminosäuren vermögen gutes Leuchten der Bakterien zu bewirken. Dies konnte durch die günstigen Leuchteffekte, die mit verschiedenen einzelnen Aminosäuren erzielt wurden, bestätigt und damit die Bedeutung der Aminosäuren für den Leuchtprozeß erneut herausgestellt werden. Es trifft also nicht zu, die Leuchtbakterien als "Pepton bedürftige Organismen" hinzustellen (vergleiche RIPPEL-BALDES, Grundriß der Mikrobiologie III.Auflage 1955).

Einen beschleunigenden Einfluß auf das Nachlassen des Leuchtens scheinen die Chinone (Farbstoffe), die als Ektotoxine der Mycelien abgeschieden werden, zu bewirken. Diese Annahme dürfte durch Beobachtungen mit Fusarium culmorum-, Fusarium "Erde"- und Fusarium lycopersicum-Kulturen sowie durch meine Versuche mit Naphthochinon, die schon in Spuren gänzliches Löschen des Leuchtens verursachten, bestätigt werden. Bei diesen Kulturen sind die bekannten flüssigen Nährmedien am deutlichsten gefärbt. In gemeinschaftlichen Nährlösungen mit Photobacterium phosphoreum stellen sie am frühesten den Leuchtprozeß ein; Fusarium culmorum nach einhundertzweiundneunzig Tagen, Fusarium "Erde" nach zweihundertzweiundsechzig Tagen und Fusarium lycopersicum nach dreihundertfünfundzwanzig Tagen. Der rote Farbstoff in Fusarium culmorum ist ein Naphthochinon. Es sei nur kurz erwähnt, daß Chinone als Mitosegifte wirken sowie auch verschiedene Enzymreaktionen hemmen.

Außerdem wird die A u f r e c h t e r h a l t u n g d e s f ü r d e n L e u c h t p r o z e ß g ü n s t i g e n pH-W e r t e s durch den Stoffwechsel der Fusarien bewirkt. Das

Photobacterium phosphoreum kann wohl bei einem niedrigeren pH-Wert im flüssigen Nährmedium noch weiterleben, aber es stellt das Leuchten ein. (FRIEDBERGER und DÖPNER, SIX). Die durch den Pilzstoffwechsel geschaffenen pH-Werte über pH 7,2 und meistens höher, welche ein sehr gutes Leuchten ermöglichen, entsprechen vielmehr dem pH-Wert des Meerwassers von pH$\sim$8, bei welchem das Photobacterium im Meer lebt und leuchtet. Die Erhaltung einer für die Lichtentwicklung günstigen Reaktion des Mediums könnte durch einen Säureverbrauch von Seiten der Pilze erklärt werden.

Nach einer Vorstellung amerikanischer Forscher sollen am Leuchtprozeß der Bakterien reduziertes Diphosphopyridinnucleotid und Flavinmononucleotid beteiligt sein. Diese werden in Diphosphopyridinnucleotid und reduziertes Flavinmononucleotid überführt. Bei Anwesenheit eines Aldehyds mit längerer Kohlenstoffkette wird das reduzierte Flavinmononucleotid oxydiert, und es entsteht ein neues System unter Lichtaussendung. Äpfelsäure soll auch fördernd sein.(STREHLER und JOHNSON).

Die Anwesenheit der genannten Stoffe in den gemeinsamen Flüssigkeitskulturen kann durchaus möglich sein:

Ein Aldehyd mit längerer Kohlenstoffkette z. B. Decaldehyd oder Palmitinaldehyd dürfte bei dem Fettbildungsvermögen der Fusarien angenommen werden (Fischfleisch ist auch fetthaltig, Aldehyde können beim mikrobiellen Abbau entstehen).

Reduziertes Diphosphopyridinnucleotid: vielleicht könnte die Fusarinsäure, eine Pyridincarbonsäure, der Ausgangskörper sein (im Heringsfleisch die Nicotinsäure). Meine Versuche mit Pyridin ergaben recht günstige Leuchtwerte. (An dieser Stelle sei auch auf die unterschiedliche Dissoziation der Fusarinsäuremolekel bei verschiedenem pH-Wert hingewiesen.)

Riboflavin bzw. Flavomononucleotid: es besteht bei geeigneten Nährmedien durchaus ein Bildungsvermögen der Fusarien und des Saccharomyces cerevisiae für Riboflavin (auch im Heringsfleisch befindet sich Riboflavin). PELTIER und BORCHERS haben die Riboflavinsynthese verschiedener Fusarien und anderer Pilze untersucht und erhebliche Mengen festgestellt. DOUDOROFF fand einen positiven Einfluß von Vitamin B_2 auf das bakterielle Leuchten.

Bei Leuchtvorgängen von Tieren stellte man fest, daß außer Luciferin und Luciferase Magnesium, Adenosintriphosphat (HANEDA und HARVEY, Mc.ELROY), Pyrophosphat und Sauerstoff erforderlich seien. RIEDER konnte in seiner Arbeit (1957) die Beteiligung von ATP am Bakterienleuchten sehr wahrscheinlich machen. Zugabe von ATP führte indes zu keiner Förderung, da der Stoff wegen Molekülgröße nicht eindringt.

Magnesium wird im Nährmedium geboten.

Sauerstoff ist bei unserer Versuchsanstellung immer zugegen. In den Mycelien der Pilze kann der Sauerstoff sogar gespeichert werden, denn die Farbstoffe sind befähigt den Sauerstoff zu absorbieren. Sobald die Sauerstoffspannung auf Null sinkt, erfolgt wieder langsame Abgabe (RIPPEL-BALDES). Es ist anzunehmen, daß dadurch der Sauerstoffpartialdruck im Medium auf das günstigste beeinflußt wird.

Adenosintriphosphat findet sich in den Fusarienmycelien (NORD 1937), ebenso Phosphat, das angehäuft wird und im Laufe der Entwicklung wieder als Phosphorsäure in das Nährmedium zurückgegeben wird.

Von den Fusarien ist bekannt, daß F u s a r i u m o x y s p o r u m , mit welchem ein äußerst langes Leuchten bewirkt wurde, das kräftigste Dehydrasesystem besitzt (NORD 1937). Es besteht die Möglichkeit, daß von Fusarien gebildete Fermente durch Autolyse in das Nährmedium abgeschieden werden und deren prosthetische Gruppen in den Leuchtprozeß miteingeschaltet werden.

Ein Weiterforschen dieser Beziehungen zwischen Fusarien und Photobacterium phosphoreum könnte gewiß einen wesentlichen Beitrag zur Lösung des Leuchtphänomens der Bakterien geben. Meines Wissens hat sich noch niemand eingehend um die Suche nach Pilzen, die das Leuchten eines Leuchtbakteriums fördern, bemüht. Es gelang mir, mit vier verschiedenen F u s a r i e n s t ä m m e n eine Leuchtdauer des Photobacterium phosphoreum von etwa s e c h s h u n d e r t f ü n f z i g T a g e n festzustellen, was einer h u n d e r t f a c h e n V e r l ä n g e r u n g

des Leuchtens entspricht. Beim Abimpfen dieser alten Kulturen auf flüssiges synthetisches Nährmedium trat am zweiten Tag wieder sehr gutes Leuchten auf. So ließen sich von etwa siebenhundert Tage alten Gemeinschaftskulturen nach vierwöchigem Nichtleuchten gut leuchtende Photobacterium phosphoreum Kulturen abimpfen. Auch die Fusarien dieser jahrelangen Gemeinschaftskulturen lassen sich zur Weiterentwicklung bringen, was beweist, daß beide Partner noch am Leben sind.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. Es wurde die Erscheinung, daß die Gegenwart bestimmter Pilzmycelien in Leuchtbakterienkulturen die Leuchtdauer der letzten erheblich verlängert, näher untersucht.
2. Nach Herausfinden einer für Bacterium (Photobacterium phosphoreum) und Pilz gleichermaßen geeigneten voll-synthetischen, daher genau definierten, Nährlösung, wurden etwa 40 Pilzstämme hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Lichtentwicklung von Photobacterium untersucht und die Kulturen 2 Jahre hindurch laufend auf Lichtentwicklung und den Gang des pH-Wertes überprüft.
3. Es zeigte sich, daß bestimmte Pilze, z.B. Vertreter der Gattung Fusarium, das sonst nur wenige Tage anhaltende Leuchten reiner Leuchtbakterienkulturen auf das Hundertfache (!) zu verlängern vermögen.
4. Als Ursache dieser außerordentlichen, hiermit erstmalig in diesem Umfang exakt festgestellten Förderung, werden zwei Umstände erwogen:

a) langsame, langandauernde Abgabe stickstoffhaltiger, das Leuchten fördernder Stoffe von Seiten der Pilzmycelien. Hier kommen in erster Linie Aminosäuren in Betracht. Die im Mycelhydrolysat von Fusarien ermittelten Eiweißbausteine erwiesen sich größtenteils im Einzelversuch als günstig für die Lichtentwicklung unseres Bakterienstammes. Eine unmittelbare Bindung elementaren Luftstickstoffs wurde in Erwägung gezogen. Die Kjeldahlanalysen gaben aber keine sicheren Anhaltspunkte dafür.

b) Die langdauernde Aufrechterhaltung eines für das Leuchten günstigen pH-Wertes (über 6, nahe dem Neutralpunkt). Diese Wirkung des Pilzes konnte wiederholt exakt erwiesen werden: während in den Bakterienreinkulturen die Reaktion bald in einen so sauren Bereich (etwa um 5,5) abglitt, daß jedes Leuchten erlosch, wobei die Bakterien noch längere Zeit weiterlebten, stabilisierte die Gegenwart des Pilzes die Reaktion für lange Zeit um den Neutralpunkt.

5. In zeitlich sehr ausgedehnten Versuchsreihen, die bei Fusarien in mehreren Parallelen durchgeführt wurden, trat die eigenartige Erscheinung auf, daß periodische Reaktionsschwankungen vorkamen. Hier folgte das Leuchten dem pH-Gang insofern, als bei Säuerungsperioden die Lichtentwicklung abnahm und umgekehrt. Dies spricht sehr zugunsten der Annahme 4 b); dabei ist eine Zehrung der durch den Bakterienstoffwechsel anfallenden Säuren von Seiten des Pilzes wahrscheinlich.

6. Die Mycelien von Fusarium geben in das Substrat auch Thiamin (Vitamin B_1) ab, was wir durch den Schopfer-Test nachwiesen.

7. In dieses Bild fügt sich unsere Beobachtung gut ein, daß Zusätze von Thiaminaseaktivatoren (aromatische N-Körper) zur Bakterienkultur sich besonders günstig auf die Lichtentwicklung auswirkten.

Literaturverzeichnis

1) BEER u. Mitarbeiter. Biochem. J. 48, 222 (1950)

2) BERGEY , Manual of Determinative Bacteriology, sixth Edition (1948) Baltimore

3) BUKATSCH, F., Über den Einfluß von Salzen auf die Lichtentwicklung von Bakterien. Sitzungsberichte der Akad. der Wiss. Wien, Abt. I, 145,7 -10 (1936)

4) CRAMER, F., Papierchromatographie, 3. Auflage, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße (1954)

5) DOUDOROFF, M., Lactoflavin and bacterial luminescence, Enzymologica (Haag) 5 Seite 239 (1938)

6) EDELBACHER, S.- LEUTHARDT, F., Lehrbuch der Physiologiscgen Chemie 13. Auflage, Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin (1957)

7) FRIEDBERGER, E., DOEPNER, H.. Über den Einfluß von Schimmelpilzen auf die Lichtintensivität in Leuchtbakterien-Kulturen, Zbl. f. Bakt., Abt. I, Band 43, Heft 1 (1907)

8) GÄUMANN, E., Pflanzliche Infektionslehre 2. Auflage, Verlag Birkhäuser, Basel (1951)

9) HANEDA u. HARVEY, zitiert in: SIMONIS, W., Fortschr. Bot. 17,474 (1955)

10) JANKE, A., Wuchsstoff-Frage in der Mikrobiologie, Zbl. f. Bact. II, Band 100, Heft 18-23 (1939)

11) JOHNSON, F.H., "Luminous Bacteria" in Bacterial Physiology. Workman u. Wilson, New York (1952) Academic Press inc.

12) KARRER, P., Lehrbuch der Organischen Chemie II. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1950)

13) KAVANAGH, F., Advances in Enzymol. 7,461 (1947)

14) LAX, E. u. D'ANS, J., Taschenbuch für Chemiker u. Physiker II. Auflage, Springer Verlag, Berlin (1949)

15) LEMBKE, A., Ergebnisse der Theoretischen u. Angewandten Mikrobiologie, Band I, Verlag J. Neumann, Neudamm (1943)

16) LINSKENS, H. F., Papierchromatographie in der Botanik, Springer Verlag, Berlin, (1955)

17) LUTZ Über den Stoffwechsel von Fusariumarten. Phythopathol. Z. 7,585 (1934)

18) (MERCK) Chromatographie unter besonderer Berücksichtigung der Papierchromatographie. E. MERCK AG, Darmstadt

19) MOLISCH, H., Leuchtende Pflanzen 2. Auflage, Jena (1912)

20) MUDRAK, A., Beiträge zur Physiologie der Leuchtbakterien. Zbl. f. Bakt. II, 88 (1933)

21) NIETHAMMER, A., Technische Mykologie, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1947)

22) NORD, F., Enzymatische Untersuchung an Fusarium lini und Fusarium oxysporum. Biochem. Ztschr. 294, S. 251 (1937)

23) PAECH, K., Pflanzenanalyse, Springer Verlag, Berlin (1955)

24) PAECH, K., TRACEY, M. V., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, erster und dritter Band, Springer Verlag, Berlin (1956)

25) PELTIER, G. L., BORCHERS, R., J. Bact. 54, 519 (1947)

26) RAKE, S., JONES, H., Mc KEE, C.M., Proc. soc. exp. Biol. N. Y. 50, 273 (1943)

27) RAUEN, H.M., Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin, (1956)

28) RIEDER, H., Physikalisch-chemische Untersuchungen zum Energie-Haushalt des Bakterienleuchtens. Zbl. f. Bakt. 319 (1957)

29) RIPPEL-BALDES, A., Grundriß der Mikrobiologie, Springer Verlag, Göttingen (1955) 3. Aufl.

30) RIPPEL, A., Quantitative Untersuchungen über die Abhängigkeit der N-Assimilation von der Wasserstoffionenkonzentration bei einzelnen Pilzen. Arch. f. Mikrobiol. 2 (1931)

31) SIMONS, W., Fortschritte d. Bot. 17, 474 (1955)

32) SIX, K., Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Leuchtbakterien. Dissertation München (1954)

33) TURBA, F., Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie, Springer Verlag, (1954) Berlin

34) VOGEL, H., KNOBLOCH, H., Chemie und Technik der Vitamine, III. Auflage, I.Teil, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1955)

S c h l u ß w o r t

Vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

Den Herrn Direktoren, Herrn Professor Dr. RENNER, Herrn Professor Dr. MÄGDEFRAU und Herrn Professor Dr. BRAUNER danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Für die Anregung und wissenschaftliche Betreuung der Arbeit bin ich Herrn Professor Dr. BUKATSCH zu großem Dank verpflichtet.

Ferner danke ich Frau Professor Dr. NIETHAMMER, Herrn Dr. POSCHENRIEDER, Herrn Dr. NEUMANN und Herrn Dr. MÜLLER für die freundliche Überlassung von Pilzstämmen.

Die Firmen HOFFMANN-LA ROCHE und E.MERCK stellten mir für meine Versuche wertvolle Substanzen zur Verfügung; ich bin ihnen hierfür sehr dankbar.

L e b e n s l a u f

Am 24. November 1921 wurde ich als erstes von drei Kindern des jetzigen Oberst a. D. Friedrich August HESSE und seiner Ehefrau Eva-Maria, geb. WESTPHALSBERGER, in Darmstadt geboren.

Nach vier Jahren Volksschule trat ich Ostern 1932 in die Höhere Schule ein. Die vielen Versetzungen meines Vaters als aktiver Offizier, denen meistens ein Wohnortswechsel der Familie folgte, brachten häufige Schulwechsel mit sich. (Ostern 1932 bis Oktober 1935 Eleonoren-Schule, Lyzeum für Mädchen in Darmstadt, Oktober 1935 bis November 1936 Institut St. Mariä, Lyzeum für Mädchen in Darmstadt, November 1936 bis Ostern 1939 Hansa-Oberrealschule in Hamburg, seit Ostern 1939 Laube-Schule, Oberschule für Jungen (früheres Reform-Realgymnasium) in Sprottau Niederschlesien). Am 15. März 1940 erhielt ich an der Laube-Schule mein Reifezeugnis.

Nach einem halbjährigen Kriegshilfsdienst und einem halbjährigen Reichsarbeitsdienst trat ich als Apothekerpraktikant in die Königlich Privilegierte Mohren-Apotheke zu Sprottau ein. Im März 1943 legte ich mein Apothekervorexamen mit gutem Erfolg bei der Regierung von Niederschlesien in Liegnitz ab.

Auf Grund damaliger Bestimmungen wurde ich von der Regierung Notdienst beordert und bis zum Sommersemester 1944 nicht zum Universitätsstudium zugelassen.

Im Sommersemester 1944 begann ich mein Studium der Naturwissenschaften - vor allem Pharmazie - an der Deutschen Karls Universität in Prag. Diesem Studiensemester folgten erneute Notdienstbeorderungen der Regierung und Einberufung zum Wehrdienst.

Nach meiner Flucht am 11. Februar 1945 traf ich Ende April 1945 in Teisendorf/Obb. ein. Teisendorf wurde der neue Wohnort meiner Familie. Seit August 1945 war ich in der dortigen Marien-Apotheke als Apothekerassistentin tätig. Zum Wintersemester 1948 konnte ich mein Studium in Pharmazie an der Universität München fortsetzen, und beendete es mit dem Staatsexamen im Dezember 1951.

In meinem weiteren Studium widmete ich mich neben praktischer Tätigkeit in der Apotheke vor allem der Botanik, Mikrobiologie, Hygiene, Physiologischen Chemie und Pharmakologie. Im Sommersemester 1954 begann ich mit der Durchführung vorliegender Dissertationsarbeit bei Herrn Professor Dr. F. BUKATSCH. Infolge eines Unfalls mußte die Arbeit von September 1955 bis Juni 1956 unterbrochen werden.